

Darstellung und Screening von kombinatorischen [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken an planaren Oberflächen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Chemie
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

vorgelegt von
Dipl.-Chem. Dirk Scharn
geboren am 20.07.1971 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin,
Prof. Dr. J. Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. B. Ronacher

Gutachter: 1. Prof. J. Liebscher
2. Prof. J. Schneider-Mergener
3. Prof. A. Beck-Sickinger

Datum der mündlichen Prüfung: 6. Juni 2001

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Aufgabenstellung	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Aufgabenstellung	7
2	Entwicklung einer SPOT-Synthesestrategie für [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken durch intermolekulare S_NAr	9
2.1	Planare Oberflächen in der SPOT-Synthese	10
2.1.1	Zellulosemembranen; etablierte Träger für Oligomersynthesen	10
2.1.2	Polypropylenmembranen; neue Träger in der SPOT-Synthese	13
2.2	Linkersysteme für die SPOT-Synthese	17
2.2.1	Basisch spaltbare Linkersysteme	18
2.2.2	Sauer spaltbare Linkersysteme	18
2.2.3	Photolytisch spaltbare Linkersysteme	22
2.3	Immobilisierung von 2,4,6-Trichlor-[1,3,5]-triazin an aminoderivatisierten planaren Oberflächen	24
2.4	Nucleophile Substitution an membrangebundenen 4,6-Dichlor-[1,3,5]-triazinen	29
2.4.1	Verwendung von <i>N</i> -Nucleophilen unter SPOT-Synthese-Bedingungen	30
2.4.2	Verwendung von <i>O</i> -Nucleophilen unter SPOT-Synthese-Bedingungen	46
2.5	Nucleophile Substitution an membrangebundenen 6-Monochlor-[1,3,5]-triazinen	50
2.5.1	Verwendung von Aminen unter SPOT-Synthese-Bedingungen	50
2.5.2	Verwendung von Phenolaten unter SPOT-Synthese-Bedingungen	58
2.6	Synthese von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken unter optimierten Bedingungen	61
2.7	Zusammenfassung; Möglichkeiten und Grenzen der <i>intermolekularen</i> S _N Ar am 2,4,6-Trichlor-[1,3,5]-triazin unter SPOT-Synthese-Bedingungen	67
3	[1,3,5]-Triazin-Bibliotheken durch intramolekulare S_NAr; Eine neue Cyclisierungsmethode für Peptide und Peptidmimetika	68
3.1	Einfluss der Ringgrösse auf die Effizienz der Cyclisierung	69
3.1.1	Variation der Cyclengrösse bei konstanter Sequenzlänge	69
3.1.2	Variation der Cyclengrösse bei variabler Sequenzlänge	71
3.1.3	Minimierung der erreichbaren Ringgrösse durch Verwendung von Aminosäuren mit verkürzter Aminosäurekette	73
3.2	Kompatibilität der Cyclisierungsmethode mit proteinogenen Aminosäuren	75
3.3	Variation der Cyclisierungsrichtung	78
3.4	Nucleophile Substitution an cyclischen 6-Monochlor-[1,3,5]-triazinderivaten	79
3.5	Weitere lineare Oligomere mit orthogonal geschützten Aminogruppen	81
3.5.1	Peptomere als lineare Sequenzen für die Cyclisierung	82
3.5.2	Peptide als lineare Sequenzen für die Cyclisierung	84

3.6	Intramolekulare S _N Ar–Reaktionen an weiteren halogenierten Heteroaromaten	85
3.6.1	2,4,6-Trichlorpyrimidin	86
3.6.2	4,6-Dichlor-5-nitropyrimidin	91
3.6.3	2,6,8-Trichloro-7-methyl-7 <i>H</i> -purin	93
3.7	Zusammenfassung: Möglichkeiten und Grenzen der <i>intramolekularen</i> S _N Ar an halogenierten Heteroaromaten unter SPOT-Bedingungen	98
4	Einsatz von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken in biologischen Assay-Systemen	99
4.1	Bindungsassays an Festphasen-gebundenen [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken mit einem monoklonalen Antikörper	99
4.2	Lösliche [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken in einem Agardiffusions-Assay	111
5	Zusammenfassung und Ausblick	121
6	Experimentelle Bedingungen und Durchführung	126
6.1	Allgemeines	126
6.2	Synthesen an polymeren Harzkugeln	128
6.2.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften	128
6.2.2	Spezielle Synthesen	129
6.2.2.1	Modellverbindungen	129
6.2.2.2	Verbindungen für ELISA Experimente	132
6.3	Synthesen an planaren Oberflächen	137
6.3.1	Allgemeine Arbeitsvorschriften	137
6.3.2	Membranfunktionalisierung	147
6.3.2.1	Aminofunktionalisierte Zellulosemembran	147
6.3.2.2	Aminofunktionalisierte PP-Membran	147
6.3.2.2.1	Ausgehend von carbonsäurefunktionalisierten PP-Membranen	28 147
6.3.2.2.2	Ausgehend von methylesterfunktionalisierten PP-Membranen	29 148
6.3.3	Spezielle Synthesen von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken an Zellulosemembranen	148
6.3.3.1	Halbautomatische Synthese einer Peptomer-[1,3,5]-Triazin-Bibliothek	91 157
6.3.3.2	Cyclisierungen durch intramolekulare Substitution am Dichlor-[1,3,5]-triazin an der Zellulosemembran	162
6.3.3.3	[1,3,5]-Triazin-Bibliotheken für das Festphasen-Screening	173
6.3.3.4	[1,3,5]-Triazin-Bibliotheken für das Agardiffusions-Assay	174
6.3.4	Spezielle Synthesen von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken an PP-Membranen	176
6.4	Durchführung der biologischen Assays	178
6.4.1	Bindungsstudien mit mAk TAB-2 an Triazin-Bibliotheken	178
6.4.2	Kompetitiver ELISA am mAk TAB-2	178
6.4.3	Agardiffusions-Assay mit rSSTR2-enthaltenden Reporterhefen	179
7	Literaturverzeichnis	180

Zusammenfassung:

Durch parallele SPOT-Synthese wurden trisamino- und amino-oxo-substituierte [1,3,5]-Triazine auf Zellulose- und Polypropylenmembranen dargestellt. Neben der Entwicklung geeigneter Linkerstrategien und dem Einsatz von Aminen und Phenolaten als Bausteine konnte eine Mikrowellenbestrahlung für die Substitution an den membrangebundenen Monochlor-[1,3,5]-triazinen nutzbar gemacht werden. Der Einsatz von gasförmiger TFA zur Abspaltung der Syntheseprodukte von den planaren Oberflächen erlaubte den Erhalt der örtlichen Adressierbarkeit der Verbindungen für Analyse und Screening.

Zusätzlich wurde ein neues Konzept für die Synthese von makrocyclischen Peptidmimetika entwickelt. Diese Methode bedient sich der sequenziellen S_NAr -Reaktion von ursprünglich orthogonal geschützten Aminogruppen eines Peptides und anderer linearer Oligomere an halogenierten Heteroaromaten wie 2,4,6-Trichloro-[1,3,5]-triazin, 2,4,6-Trichloropyrimidin, 4,6-Dichloro-5-nitropyrimidin und 2,6,8-Trichloro-7-methyl-7*H*-purin. Die Möglichkeiten dieses neuen Zugangs zu Makrocyclen wurde systematisch mittels SPOT-Synthese untersucht. So wurden Fragen wie zugängliche Ringgrößen, Kompatibilität mit Aminosäuren, Cyclisierungsrichtungen und Verwendung von unterschiedlichen linearen Oligomeren adressiert. Es stellte sich heraus, dass eine Reihe von Peptidmimetika mit unterschiedlichen Ringgrößen (11- bis 37-gliedrige Ringe) und verschiedenen chemischen Strukturen des Rückgrades erhalten werden können.

Die erhaltenden [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken wurden sowohl in einem Festphasen-Screening als auch in einem Assay in Lösung eingesetzt. Es gelang, *de novo* Bindungspartner für den monoklonalen Antikörper TAB-2 aus einer Bibliothek aus 8000-zellulosegebundenen [1,3,5]-Triazinen zu finden und neuartige cyclische Peptid-Triazinderivate als Agonisten für einen Somatostatinrezeptor zu entwickeln.

Schlagnworte: Kombinatorische Chemie, Heterocyclen, SPOT-Synthese, Screening

Abstract:

Effective spatially addressed parallel assembly of trisamino- and amino-oxy-1,3,5-triazines was achieved by applying the SPOT-synthesis technique on cellulose and polypropylene membranes. In addition to developing a suitable linker strategy and employing amines and phenolate ions as building blocks, a highly effective microwave assisted nucleophilic substitution procedure at membrane-bound monochlorotriazines was developed. The 1,3,5-triazines obtained could be cleaved in parallel from the solid support by TFA-vapor to give compounds adsorbed on the membrane surface in a conserved spatially addressed format for analysis and screening.

A novel concept for the synthesis of macrocyclic peptidomimetics which incorporate heteroaromatic units was developed. The method involves sequential S_NAr reactions of former orthogonally protected amino groups of peptides and other linear oligomers on halo-generated heterocycles such as 2,4,6-trichloro-[1,3,5]-triazine, 2,4,6-trichloropyrimidine, 4,6-dichloro-5-nitropyrimidine and 2,6,8-trichloro-7-methyl-7*H*-purine. The scope of this novel solid phase approach was systematically evaluated by means of the SPOT-synthesis methodology. Besides the question of the accessibility of different ring sizes and the compatibility with protecting groups of commonly used amino acids, cyclization direction and the applicability of the technique towards peptidomimetics was studied. It was found that the procedure is well suited to assemble a wide variety of cyclic peptidomimetics differing in both size (11 to 37-membered rings) and chemical nature of the assembled backbones.

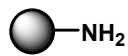
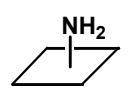


The obtained [1,3,5]-triazine libraries were subjected to heterogeneous and homogeneous screening assays. *De novo* binding partners for the monoclonal antibody Tab2 were detected from a 8000-membered library of cellulose-bound 1,3,5-triazines. In addition novel cyclic peptide-triazine derivatives were identified as agonists for a somatostatin receptor.

Keywords: combinatorial chemistry, heterocycles, SPOT-synthesis, screening

Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
Ac	Acetyl
Äq.	Äquivalent(e)
BLU	<i>Boehringer light units</i>
BOC	<i>tert.</i> -Butyloxycarbonyl
DABCO	[2.2.2] Diazabicycloundecan
DBF	Dibenzofulven
DBU	1,8-Diazabicyclo[5,4,0]undec-7-en
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIEA	Diisopropylethylamin
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dnp	2,4-Dinitrophenyl
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FAU	<i>Finnigan area units</i>
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
h	Stunde(n)
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high-pressure liquid chromatography</i>
HRMS	<i>high resolution mass spectrometry</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
Me	Methyl
min	Minute(n)
Mtt	4-Methyltrityl
MW	Mikrowellenbestrahlung
NEM	<i>N</i> -Ethylmorpholin
Np	4-Nitrophenyl
NMI	<i>N</i> -Methylimidazol
NMP	<i>N</i> -Methylpyrrolidon
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
Pfp	Pentafluorphenyl
Pip	Piperidin
POD	Peroxidase
PNA	<i>peptide nucleic acid</i>
PP	Polypropylen
prim.	primär
R _t	Retentionszeit
sek.	sekundär
SG	Schutzgruppe

S _N Ar	nucleophile aromatische Substitution
TFA	Trifluoressigsäure
TMSCl	Trimethylsilylchlorid
Trt	Trityl
wt	Wildtyp = natives Peptid bei Bindungsstudien zu Proteinen

	aminoderivatisiertes Syntheseharz
	aminoderivatisierte planare Oberfläche
	Photolyse labiler Linker
	Rink-Amid-Linker

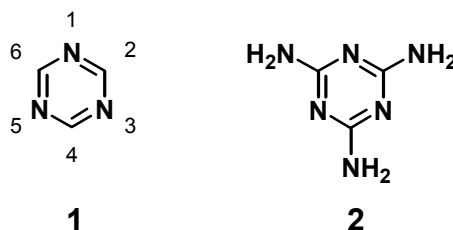
Für proteinogenen Aminosäuren wurde der Ein- und Drei-Buchstaben-Code verwendet:

1- Buchstaben- Code	3- Buchstaben- Code	Aminosäure	1- Buchstaben- Code	3- Buchstaben- Code	Aminosäure
A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparagin- säure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamin- säure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

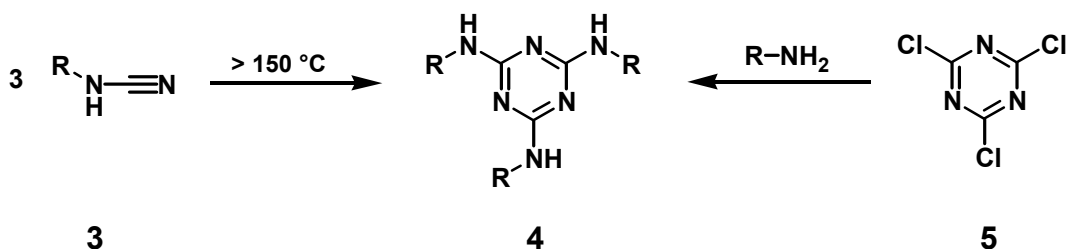
1 Einleitung und Aufgabenstellung

1.1 Einleitung

Die Chemie der Heterocyclen stellt ein bedeutendes Teilgebiet der organischen Chemie dar. Von besonderem Interesse sind dabei die Stickstoff-Heterocyclen, da sie die physiologisch wichtigsten Verbindungen der belebten Natur umfassen. Diese Heterocyclen sind zentrale Strukturelemente in z.B. den Basen der Nukleinsäuren, den Aminosäuren Prolin, Histidin und Tryptophan, sowie einigen Vitaminen. Darüberhinaus findet man diese Substanzklasse in den am häufigsten eingesetzten pharmakologischen Wirkstoffen wie Zovirax (antivirale Wirkung), Adalat (Calciumantagonist) oder Ofloxazin (Gyrase-Hemmer), um nur einige Beispiele zu nennen.^[1] Zu den ältesten bekannten Heterocyclen gehören die [1,3,5]-Triazine, deren Nomenklatur sich von der Numerierung der Atome in der Stammverbindung **1** ableitet.^[2-4] Bereits 1834 wurde 2,4,6-Trisamino-[1,3,5]-triazin (Melamin, **2**) als eines der ersten Derivate von **1** dargestellt.^[5]

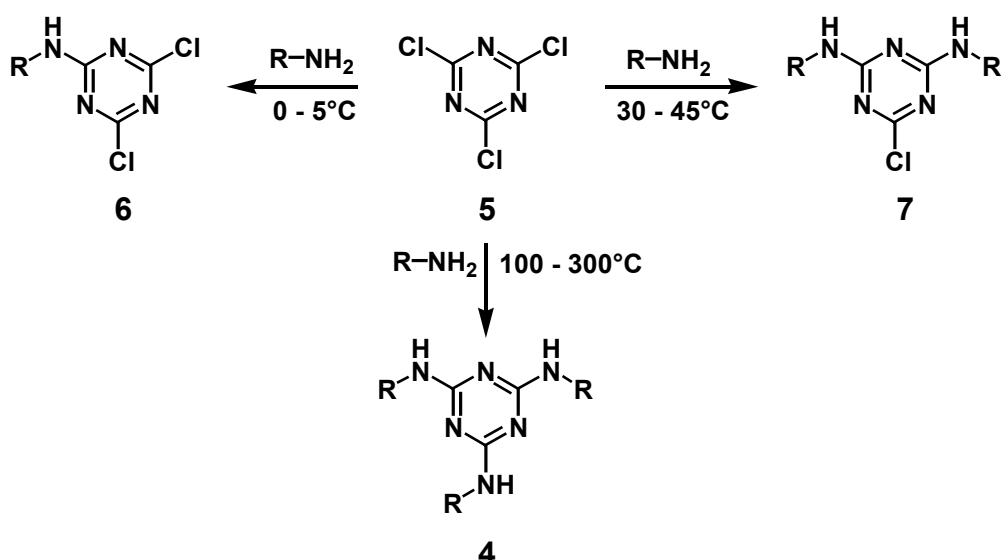


Synthetisch zugänglich sind Trisamino-[1,3,5]-triazine **4** entweder durch Cyclotrimerisierung *N*-substituierter Cyanamide **3** oder mittels Substitution der Chloratome des 2,4,6-Trichlor-[1,3,5]-triazins (Cyanurchlorid, **5**) durch Amine bei erhöhten Temperaturen (Schema 1).^[6]



Schema 1: Synthetischer Zugang zu Trisamino-[1,3,5]-triazinen.

Die abgestufte Reaktivität der Chloratome des Cyanurchlorids **5** gegenüber nucleophilem Angriff durch Amine wurde von Thurston *et al.* untersucht.^[7] So zeigen die verbleibenden Chloratome nach schrittweisem Austausch durch elektronenschiebende Reste an **5** eine abnehmende Reaktivität. Das erste Chloratom lässt sich selektiv bei Temperaturen um 0°C durch Amine substituieren. Zur Substitution des zweiten Chloratoms bedarf es erhöhter Temperaturen von 30-45°C.^[8] Um das verbleibende dritte Chloratom zu substituieren, sind Temperaturen von über 100°C nötig (Schema 2).



Schema 2: Temperaturabhängige Chlorsubstitution am Cyanurchlorid **5** durch Amine nach Thurston et al.^[7]

Aufgrund dieser Reaktivitätsabstufung der Chloratome am Cyanurchlorid sind sowohl symmetrisch als auch unsymmetrisch substituierte [1,3,5]-Triazine zugänglich. Beide Gruppen werden als Herbizide^[9] und Stabilisatoren von Polymeren^[10] eingesetzt. Darüber hinaus sind sie von hoher pharmakologischer Relevanz. So wird z. B. *N,N,N',N',N'',N''*-Hexamethyl-2,4,6-triamino-[1,3,5]-triazin **8** in der Behandlung von Brust-^[11] und Eierstocktumoren^[12] und Almitrin **9** bei Atemnot^[13] eingesetzt (Abb. 1). 6-Methyltriazin **10** ist ein hoch aktiver Corticotropin-Releasing-Hormon-(CRH)-Antagonist ($K_i = 6$ nM gegen hCRH₁)^[14] für die Behandlung von Depressionen und Angstzuständen.

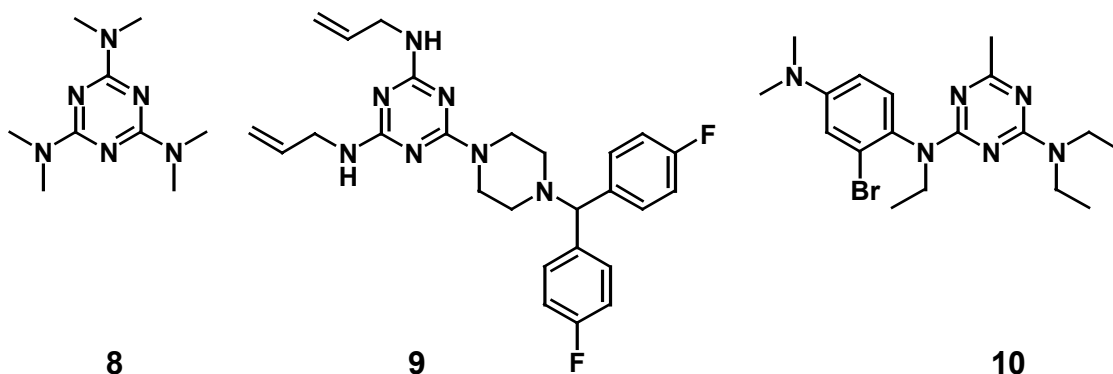


Abb. 1: Beispiele für pharmakologisch relevante [1,3,5]-Triazine.

In Anbetracht dieser Beispiele ist zu erwarten, dass auch weitere unsymmetrisch substituierte [1,3,5]-Triazinderivate bedeutsame pharmakologische Eigenschaften aufweisen. Aufgrund der drei selektiv zu substituierenden Positionen am [1,3,5]-Triazinring liesse sich eine nahezu unbegrenzte Anzahl unsymmetrischer Derivate darstellen, vorausgesetzt, es stehen geeignete Hochdurchsatz-Synthesesysteme und entsprechende Screeningmethoden zur Verfügung. Während die Voraussetzung zur Untersuchung vieler tausend Verbindungen hinsichtlich pharmakologischer Wirkung in kurzer Zeit (*Hochdurchsatz-Screening*) durch die Fortschritte in der Entwicklung von biologischen Testsystemen (*Assays*) geschaffen wurden,^[15] sind die Möglichkeiten der klassischen

organischen Synthese zur Darstellung entsprechend hoher Zahlen an Verbindungen begrenzt.

Eine Lösung für dieses Problem stellen die Synthesemethoden der kombinatorischen Chemie dar. Die kombinatorische Chemie umfasst viele Bereiche, wie neue analytische Methoden und Techniken, computergestützte Datenverwaltung, Assay-Gestaltung sowie Syntheseplanung und Automatisierung der Synthesedurchführung. Die Synthesen in der kombinatorischen Chemie zeichnen sich dadurch aus, dass für eine Synthesestufe die Reaktion an einer funktionellen Gruppe des Eduktes nicht nur mit einem Reaktanden, sondern mit vielen Analoga des jeweiligen Reaktanden (parallel oder in Mischungen) durchgeführt wird.^[16] In jedem Syntheseschritt werden alle möglichen Kombinationen gebildet, so dass aus anfänglich nur wenigen Bausteinen (*building blocks*) in den einzelnen Syntheseschritten eine grosse Zahl an Produkten, eine sogenannte „Verbindungsbibliothek“, entsteht.^[17-21] Ein geradezu ideales Beispiel für die erreichbare Vielfalt (*Diversität*) stellt die Synthese von Peptiden dar. Für die Darstellung eines Hexapeptids aus den 20 proteinogenen Aminosäuren ergeben sich durch Kombination aller Möglichkeiten in fünf Synthesecyclen bereits 64 Millionen verschiedene Produkte.

Die Synthesemethoden der kombinatorischen Chemie können in die Bereiche der Synthese in Lösung und der Synthese an fester Phase aufgeteilt werden. Da das Ziel der Synthese in der raschen Bereitstellung grosser Substanzbibliotheken liegt, stellt die Automatisierung einen Schlüsselschritt bei der Planung und Durchführung dar. Eine solche Automatisierung ist für die kombinatorische Chemie in Lösung mit einem enormen apparativen Aufwand bei der Durchführung der Reaktionen und der anschliessenden Aufarbeitung verbunden. Als Beispiel sei hier die Synthese einer Bibliothek aus ca. 40000 Trisamino-[1,3,5]-triazinen **11** in Lösung (Abb. 2a), genannt.^[22] Ohne eine Automatisierung wurde lediglich eine kleine Bibliothek in Lösung aus 39 Amino-dioxy-[1,3,5]-triazinen **12** (Abb. 2b) synthetisiert.^[23]

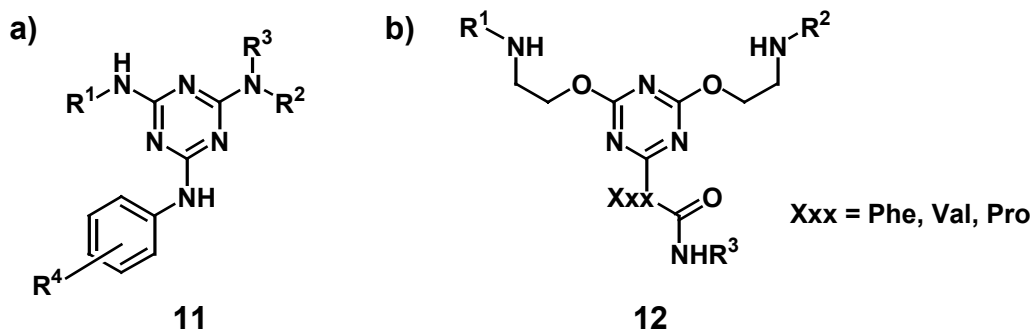


Abb. 2: In Lösung synthetisierte kombinatorische [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken.^[22, 23]

Aufgrund der Probleme der kombinatorischen Chemie in Lösung, wie etwa bei der Automatisierung, hat sich mehr und mehr die Festphasensynthese zur Darstellung grosser Substanzbibliotheken durchgesetzt. Den Grundstock für die Synthese an fester Phase legte Merrifield bereits 1963.^[24] Er stellte ein Konzept zur Peptidsynthese an Polystyrolharz als feste Phase vor, bei dem der C-Terminus des Peptides kovalent an kleinen Harzkügelchen verankert wurde. Diese Methode erlaubte erstmals, Reagenzienüberschüsse einzusetzen, die sich nach Reaktionsende durch einfaches Wegwaschen vom Harz entfernen liessen. Mit der Synthese an fester Phase eröffnete sich auch eine völlig neue Art des biologischen Screenings. So können mit den kovalent am Harz gebundenen Substanzen z.B. direkt Bindungsstudien an fluoreszenzmarkierten Proteinen durchgeführt werden.^[18]

Bei der kombinatorischen Festphasensynthese gibt es zwei grundlegende Strategien, um zu einer grossen Anzahl an Verbindungen zu gelangen; die sogenannte „split-and-mix“- und

die „parallel“-Methode. Das Grundprinzip der „split-and-mix“-Methode^[25] besteht aus der Aufteilung der Synthese-Harzkügelchen vor den Synthesestufen, der Vereinigung nach dem jeweiligen Reaktionsschritt und dem Durchmischen der Harzkügelchen. Am Ende einer solchen Synthese erhält man eine Substanzbibliothek, in der sich auf jedem Harzkügelchen (*bead*) genau eine Verbindung in vielfacher Kopie befindet („one-bead-one-compound“).^[26] Dieses Vorgehen bietet eine Möglichkeit zur raschen Darstellung einer grossen Anzahl von Verbindungen. Da die synthetisierten Substanzmengen jedoch sehr gering sind (wenige pmol pro Harzkügelchen), ist eine ausreichende Analytik nicht immer möglich. Deswegen bedient man sich spezieller Markierungen (*tagging*) der Harzkügelchen. Dabei wird ein Teil der funktionellen Gruppen eines Harzkügelchens genutzt, um neben der Zielverbindung einen speziellen Code, z.B. aus Nukleotiden, zu synthetisieren.^[27, 28] Hierfür muss eine orthogonale Schutzgruppenstrategie entworfen werden und für jede Zielverbindung in der Substanzbibliothek muss genau eine spezifische Nukleotidsequenz enthalten sein. Diese Technik ermöglicht es, ein Harzkügelchen aus der Menge herausgreifen und die jeweilige Zielstruktur anhand der Erkennungssequenz zu bestimmen.

Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, dass neben dem doppelten Syntheseaufwand, funktionelle Gruppen der Erkennungssequenz unter den Bedingungen der Synthese der Zielstruktur zu Nebenreaktionen führen können. Werden die Substanzen direkt nach dem letzten Syntheseschritt vom Trägerharz abgespalten, ist eine Codierung einzelner Verbindungen nicht möglich und es werden Substanzgemische erhalten, wie im Fall der Synthese der Trisamino-[1,3,5]-triazin-Bibliotheken **13** (Abb. 3).^[29, 30] In solchen Fällen bleibt nach massenspektrometrischer Analyse lediglich eine „ja/nein“-Aussage über die Existenz einzelner Produkte in dem Gemisch, falls die Harzkügelchen nicht einzeln behandelt werden.

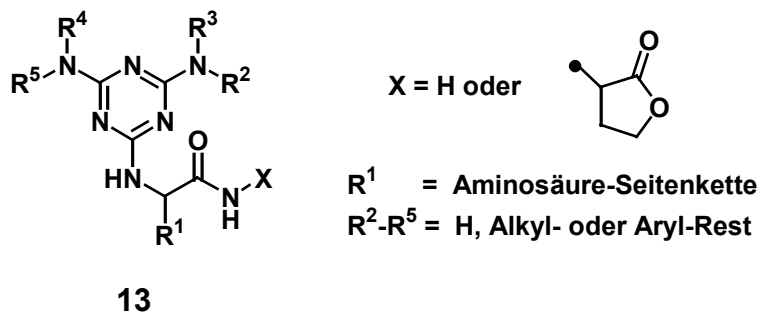


Abb. 3: Am Polystyrolharz nach der „split-and-mix“-Methode synthetisierte [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken **13**.^[29, 30]

Die Hauptnachteile der „split-and-mix“-Methode liegen im hohen Aufwand im Verlauf der Synthese (zusätzliche Reaktionen für die Codierungssequenz) und bei der Auswertung der analytischen Daten von Substanzbibliotheken nach der Abspaltung von Gemischen unterschiedliche derivatisierter Harzkügelchen.

Anders ist dies bei der ortsadressierten parallelen Synthese von Einzelverbindungen. Hierbei kann die Substanz durch ihre Position während der Synthese z.B. in einem Reaktorgefäss identifiziert werden (Abb. 4a). Eine weitere Strategie zur Festlegung der Position von Substanzen stellt die PIN-Methode dar.^[31] Hierbei werden kleine Stäbchen mit harzähnlich derivatisierten „Köpfen“ auf einer Platte fixiert (Abb. 4b) und zur Durchführung der Reaktionen in Mikrotiterplatten getaucht, die die jeweiligen Reagenzien enthalten. Die erreichbaren Substanzmengen pro „Synthese-PIN“ liegen bei max. 30 μmol – relativ wenig im Vergleich zu den in Reaktoren erzielbaren Mengen (mehrere mmol).

Bei der Darstellung von Verbindungen in festen Bereichen (*Arrays*) auf planaren Oberflächen (Abb. 4c) wird auf die Verwendung von traditionellen Reaktionsgefäßen komplett verzichtet.^[32] Die Synthese der Zielverbindungen erfolgt durch direktes Aufbringen der Reagenzien auf eine funktionalisierte Oberfläche wie z.B. Glas.^[33] Die Substanzmengen am Ende der Synthese an Glasoberflächen sind sehr gering (ca. 10 pmol), so dass ein Screening in Lösung nicht und eine Analytik meist nur schwerlich möglich sind.

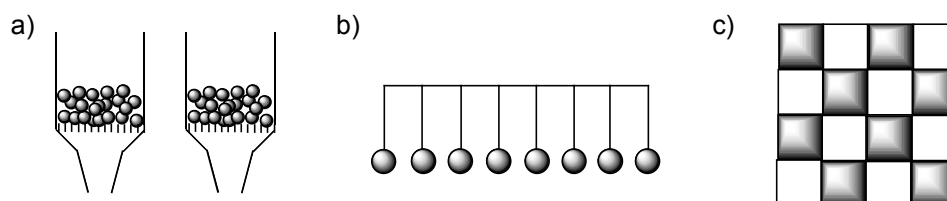
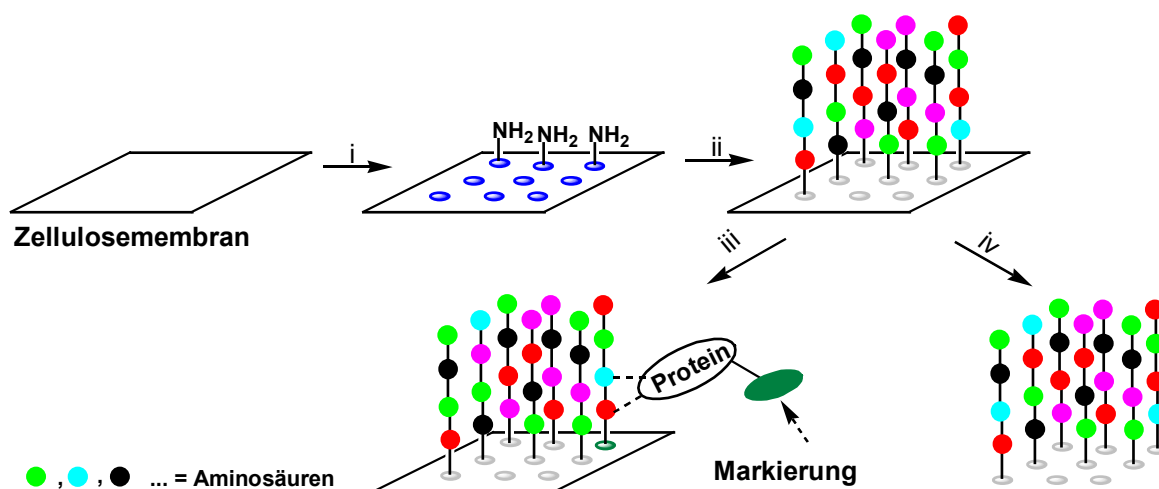


Abb. 4: Verschiedene Techniken zur parallelen Synthese an fester Phase; a) Synthesereaktoren, b) PIN-Methode, c) Arrays auf planaren Oberflächen.

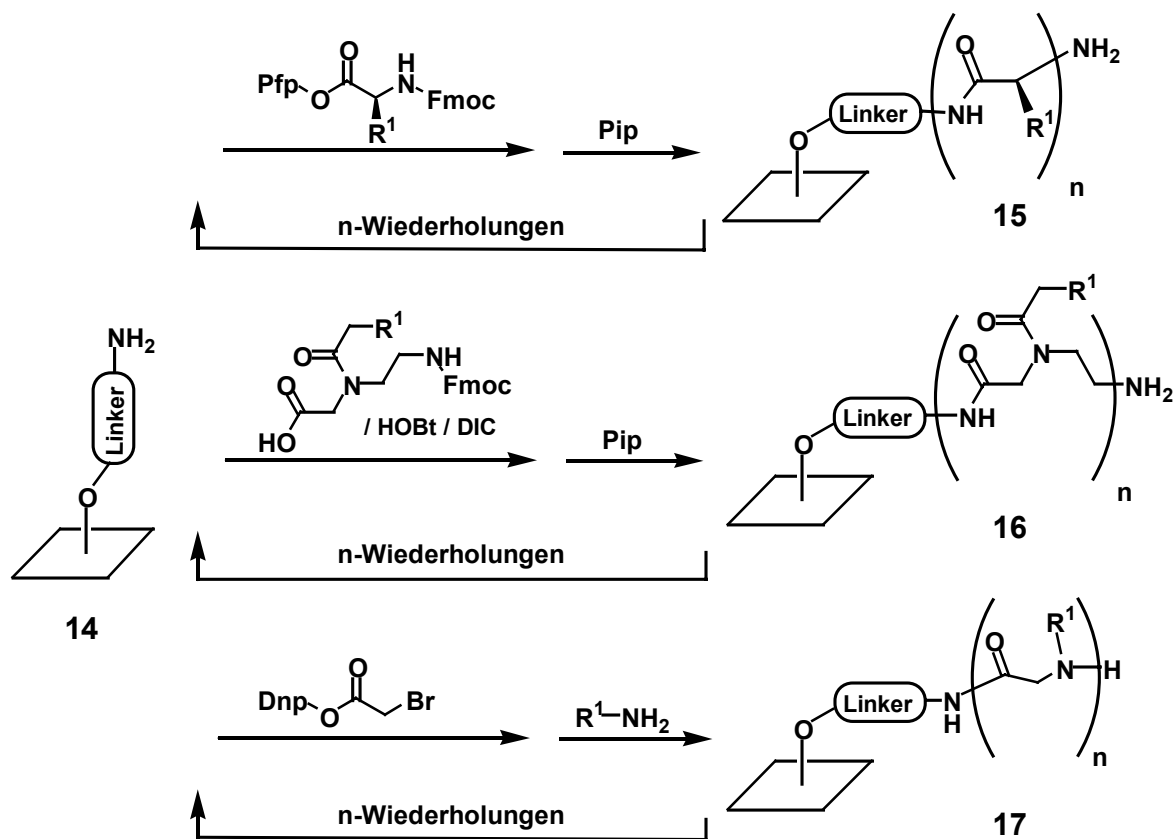
Die Synthese an Zellulosemembranen als planarem Träger wurde erstmals von Frank^[34] am Beispiel der parallelen Peptidsynthese beschrieben und als „SPOT-Synthese“ bezeichnet. Bei der SPOT-Synthese werden Lösungen der Reagenzien direkt auf die Zellulose pipettiert, so dass sich auf der Membran „Muster“ (*SPOTs*) mit verschiedenen Substanzen bilden. Die Größe der SPOTs wird durch das Volumen von einigen μl bis zu wenigen nl eingestellt. Auf einer 20 x 30 cm Membran lassen sich so bis zu 8000 Peptide darstellen, wobei nur einige Milligramm an Aminosäuren benötigt werden.^[35, 36] Für eine Visualisierung der SPOTs können die basischen *N*-Termini mit Bromphenolblau reversibel angefärbt werden.^[37] Mit den kovalent auf der Zellulose gebundenen Peptiden können direkt Bindungsstudien mit z.B. fluoreszenzmarkierten Proteinen durchgeführt werden, um so neue Bindungspartner von pharmakologisch relevanten Rezeptoren zu finden.^[35, 36, 38-41]

Im Vergleich zur Glasoberfläche kann an Zellulosemembranen bis zu 100-mal mehr Substanz pro Fläche synthetisiert werden, was u.a. an dem faserigen Netzwerk der Zellulose und der damit verbundenen vergrößerten „inneren Oberfläche“ liegt. Man erhält nach Abspaltung von der Zellulose ausreichend Substanz für z.B. HPLC-MS Analytik oder für Tests in Lösung (Schema 3).^[42]



Schema 3: Definition der SPOTs und Anfärben der Aminogruppen (i). Nach schrittweiser ortsadressierter Synthese der Peptide (ii) können direkt Bindungsstudien mit markierten Proteinen (iii) oder Abspaltung der SPOTs für Analytik bzw. Tests in Lösung (iv) folgen.

Das Verteilen von Reagenzien auf der planaren Oberfläche kann durch einen Pipettierroboter automatisiert werden,^[43] was neben einer Zeitersparnis auch ein präziseres Arbeiten (kleinere SPOTs mit geringerem Abstand zueinander) bei der Synthese ermöglicht. Hierzu werden die Bausteine aus Vorratsgefäßen von einem Roboter angesaugt und auf die Zellulosemembran pipettiert (*gespottet*). Die jeweilige Sequenz der Oligomere mit der dazugehörigen Position wird zuvor mittels einer speziellen Software (LISA, Vers. 1.53) festgelegt. Die SPOT-Synthese bietet eine Kombination aus effizienter Darstellung von Substanzen in Hinblick auf benötigtes Material und Zeit und den Möglichkeiten eines schnellen, hochparallelen Screenings der dargestellten Verbindungen. Im Vergleich zu Synthesen an Harzen ist man bei der SPOT-Synthese bzgl. der eingesetzten Reagenzien und Reaktionsbedingungen deutlich eingeschränkt, da es sich hier um ein offenes System handelt. Luft- oder wasserempfindliche Reaktionen sind ebenso problematisch wie die Steuerung der Reaktionszeit (die wenigen verwendeten μl verdampfen bei Raumtemperatur in sehr kurzer Zeit) oder der Reaktionstemperatur. Trotzdem gelang es, mit der SPOT-Synthese lineare Oligomere wie z.B. Peptide^[44, 45] **15**, PNAs^[46, 47] **16**, Peptoide **17** und Peptomere^[48-52] (Hybride aus Peptiden und Peptoiden^[53]) darzustellen, da deren Synthese kompatibel mit den Rahmenbedingungen der SPOT-Synthese ist (Schema 4).



Schema 4: Darstellung von Peptiden **15** PNAs, **16** und Peptoiden **17** mittels SPOT-Synthese.

Der Einsatz von Peptiden als Therapeutika ist aufgrund ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften wie z.B. mässige orale Verfügbarkeit oder teilweise geringer Serumstabilität problematisch.^[54, 55] Aus diesem Grund ist man in der pharmazeutischen Forschung an Peptidmimetika interessiert.^[56, 57] Ursprünglich wurden Verbindungen als Peptidmimetika bezeichnet, die im Stoffwechsel die Funktion von Peptiden erfüllen, sich jedoch strukturell von ihnen unterscheiden.^[58-61] Mittlerweile gelten allgemein auch Verbindungen als

Peptidmimetika, die sich durch den Austausch einzelner Atome oder Gruppen^[62] bzw. den Einbau nicht-natürlicher Strukturen oder Abstandshalter^[63, 64] von Peptiden ableiten,^[65] ohne Berücksichtigung der biologischen Aktivität.

Einige Probleme wie z.B. die biologische Verfügbarkeit des Wirkstoffes kann man jedoch mit oligomeren Peptidmimetika wie z.B. Peptoiden oder PNAs nicht vollständig lösen.^[66, 67] Der Schwerpunkt der kombinatorischen Chemie für die Wirkstoffforschung liegt deswegen momentan in der Entwicklung von kleineren, meist heterocyclischen Verbindungen mit einer Molmasse bis ca. 500 g/mol.^[68-70]

1.2 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Potential der SPOT-Synthese auch für die hochparallele Darstellung und das Screening von Heterocyclen am Beispiel der [1,3,5]-Triazine nutzbar zu machen. Die Darstellung der Substanzbibliotheken sollte auf Zellulose- und Polypropylenmembranen erfolgen. Die Verwendbarkeit der erhaltenen Substanzbibliotheken für Screening-Zwecke sollte in Modellsystemen zur Findung bioaktiver [1,3,5]-Triazine getestet werden.

Es galt folgende Aufgaben zu bearbeiten und zu lösen:

(1) Membranderivatisierung und Linkersysteme

Für die Synthese an Zellulosemembranen standen sowohl eine Aminoderivatisierung als auch jeweils ein basisch, sauer und photolytisch spaltbares Linkersystem zur Verfügung, die für die SPOT-Synthese von Peptiden^[45] und Peptoiden^[49, 52] bereits erfolgreich eingesetzt wurden. Im Gegensatz dazu mussten an der Polypropylenmembran (PP-Membran) erst eine geeignete Derivatisierung und die Synthesen verschiedener Linkersysteme erarbeitet werden. Besonderen Wert sollte bei der Derivatisierung der PP-Membran auf eine Verringerung der hydrophoben Eigenschaften der Oberfläche gelegt werden, um im Verlauf des Screenings in wässrigen Puffersystemen unspezifische Wechselwirkungen mit den entsprechenden Proteinen zu unterdrücken.

(2) Synthesen von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken durch *intermolekulare* S_NAr am Cyanurchlorid unter SPOT-Bedingungen

Für die Synthese von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken sollten Bedingungen zur Immobilisierung von Cyanurchlorid an aminoderivatisierten planaren Oberflächen gefunden werden. Zur Erhöhung der Diversität der späteren Bibliotheken sollte diese Anknüpfung nicht nur direkt an der Aminogruppe der Linker, sondern zusätzlich an den N-Termini von Peptiden und Peptoiden erfolgen. Anschliessend waren Synthesekonzepte zur Darstellung von unsymmetrisch amino- und amino/oxy-substituierten [1,3,5]-Triazinen durch schrittweise intermolekulare Substitution der verbleibenden Chloratome des Cyanurchlorids durch Amine und Alkohole zu entwickeln und zu untersuchen. Unter den Rahmenbedingungen der SPOT-Synthese waren diese Methoden zu optimieren und im Anschluss für die Synthesen von Bibliotheken anzuwenden.

(3) Synthesen von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken durch *intramolekulare* S_NAr an Dichlor-[1,3,5]-triazinderivaten unter SPOT-Bedingungen

Desweiteren sollte untersucht werden, ob durch schrittweise intramolekulare S_NAr an 4,6-Dichlor-[1,3,5]-triazin-2-ylaminen auch makrocyclische [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken

erhalten werden können. Hierfür galt es, eine geeignete Schutzgruppenstrategie zu entwickeln, um selektiv unterschiedliche nucleophile Gruppen z.B. eines Peptides zur Chlorsubstitution einsetzen zu können. Im Rahmen der Untersuchungen sollten Fragen wie z.B. die erreichbaren Ringgrößen oder die Kompatibilität mit den proteinogenen Aminosäuren und deren Schutzgruppen geklärt werden.

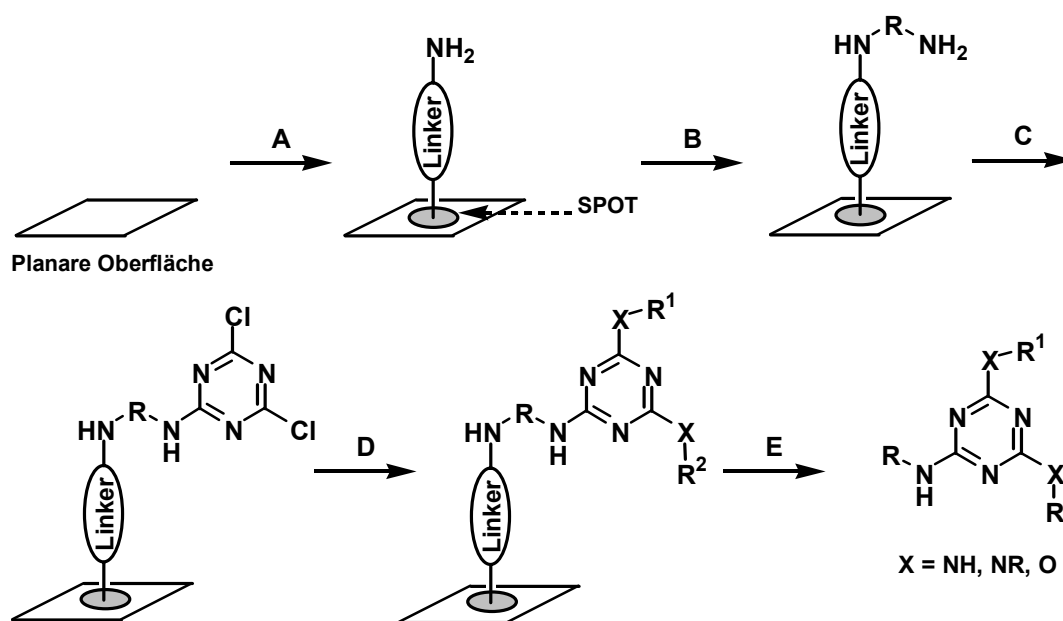
(4) Untersuchung der [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken in verschiedenen Assayformaten

Die allgemein verwendeten Assay-Systeme lassen sich in zwei Gruppen aufteilen; Festphasen-Assays und Assays in Lösung. Zur Demonstration, dass die mittels SPOT-Synthese erhaltenden [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken in beiden Assayformaten eingesetzt werden können, wurde jeweils ein Modellsystem gewählt. Als Modellsystem für das Festphasen-Screening sollte der Bindungs-Assay mit dem gut charakterisierten monoklonalen Antikörper (mAk) TAB-2 verwendet werden.^[35, 36, 38, 71] Mit Hilfe einer zellulosegebundenen Bibliothek aus 8000 Verbindungen sollten *de novo* [1,3,5]-Triazine identifiziert werden, die an den Antikörper binden. Die Affinitäten der Verbindungen zum Antikörper sollten mittels kompetitivem ELISA in Lösung quantitativ bestimmt werden. Zusätzlich sollten im Festphasen-Assay mit dem mAk TAB-2 die Screening-Eigenschaften der Zellulose- und der PP-Membran verglichen werden.

Als Modell für Screeningsysteme in Lösung diene ein Agardiffusions-Assay mit einer modifizierten Hefe, die den Somatostatin Rezeptor Typ II (SSTR2) trägt. Im Gegensatz zu Bindungsstudien handelt es sich hierbei um ein funktionelles Assay, in dem die Testsubstanzen in gelöster Form eingesetzt werden und ggf. zu einer Vermehrung der Hefezellen führen. Der natürliche Ligand S14 des SSTR2, ein 14-meres Peptid mit einer Disulfidbindung (AG-c[CKNFFWKFTFTSC]-COOH), ist ein Inhibitor der Sekretion von z.B. Wachstumshormonen. Das S14 sollte gezielt durch [1,3,5]-Triazineinheiten modifiziert werden. Aktive Verbindungen dieses Typs sind für die Entwicklung neuer pharmazeutischer Wirkstoffe zur Tumorbekämpfung und -diagnostik von grossem Interesse.^[72-74]

2 Entwicklung einer SPOT-Synthesestrategie für [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken durch intermolekulare S_NAr

Ein wichtiger Punkt für die geplante Entwicklung von kombinatorischen [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken an planaren Oberflächen ist die Auswahl eines geeigneten Trägermaterials für die Synthese. Die verwendeten Oberflächen müssen sich in derart funktionalisieren lassen, dass eine stabile Verankerung verschiedenster Linker gegenüber Nucleophilen möglich ist (**A** in Schema 5). Eine Aminofunktionalisierung der eingesetzten Linker ist von Vorteil, da so eine möglichst hohe Diversität der späteren [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken durch den „Einbau“ linearer Oligomere wie Peptide oder Peptioide erreicht werden kann (**B** in Schema 5). Die Anknüpfung des [1,3,5]-Triazinringes kann durch Reaktion der membrangebundenen Aminogruppen mit Cyanurchlorid **5** erfolgen (**C** in Schema 5).



Schema 5: Geplante Vorgehensweise zur Erzeugung von diversen [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken an planaren Oberflächen; ein Linker wird auf einer planaren Oberfläche verankert (**A**), Reaktion der Aminofunktion des Linkers mit geeigneten Reagenzien zur Diversitätssteigerung (**B**) mit anschließender Immobilisierung von Cyanurchlorid (**C**) und schrittweisem Austausch der verbleibenden Chloratome (**D**) sowie Abspaltung vom polymeren Träger (**E**).

Eine Erhöhung der Diversität der [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken sollte durch Verwendung von *N*- und *O*-Nucleophilen zur schrittweisen Substitution der Chloratome erreicht werden (**D** in Schema 5). Die Reaktion von **5** mit Alkoholen wurde bislang nur in Lösung bei erhöhten Temperaturen^[7, 8, 23, 75, 76] beschrieben. Im Verlauf dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob spezielle Bedingungen für die SPOT-Synthese gefunden werden können. Um den erforderlichen Arbeitsaufwand deutlich zu minimieren, sollte die Abspaltung der [1,3,5]-Triazine von dem polymeren Träger parallel und unter Erhalt der örtlichen Adressierung erfolgen (**E** in Schema 5). Die SPOTs mit den einzelnen Verbindungen können dann im Nachhinein in Mikrotiterplatten ausgestanzt werden, um sie für Analytik oder Screening einzusetzen.

2.1 Planare Oberflächen in der SPOT-Synthese

Mit voranschreitender Entwicklung in der Festphasensynthese wurden eine Vielzahl von Materialien als Träger verwendet. Anfänglich beschränkte man sich auf polymere Harze und deren Derivatisierung. Polymere Membranen wurden hingegen erst später als Trägermaterial für die Festphasensynthese entdeckt.^[77, 78] Glas wurde als flächiger Träger in der Peptidsynthese unter Lichtbestrahlung beschrieben, wobei ca. 600 Peptide pro cm² synthetisiert werden konnten.^[33, 79] Allerdings sind die erhaltenen Mengen der Peptide an der Glasoberfläche sehr gering (ca. 10 pmol), was zu Problemen bei der Analytik der Produkte führen kann. Kürzlich konnte eine Glasoberfläche für die kovalente Verankerung von nicht-peptidischen Strukturen genutzt werden.^[80] Diese Mengen sind lediglich ausreichend für Bindungsstudien mit Proteinen in Festphasen-Assays, jedoch nicht für Assays in Lösung.

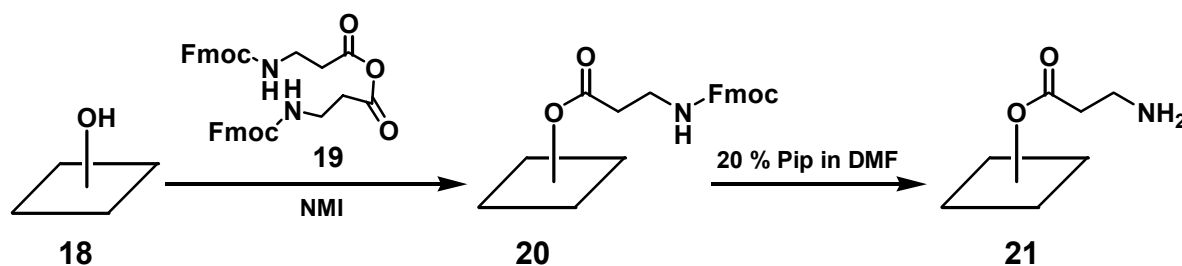
Allgemein haben poröse Membranen gegenüber Harzen einige Vorteile wie z.B. höhere mechanische Belastbarkeit und ein besseres Verhältnis von Oberfläche zu Funktionalisierungsgrad.^[81] So konnten Zellulosemembranen als planaren Oberflächen für die Synthese von Peptiden etabliert werden.^[35, 45, 49, 52, 82-89]

Es sollte untersucht werden, ob Zellulosemembranen trotz des Überschusses an Hydroxylgruppen ebenso gut für die Darstellung von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken geeignet sind, wie die bereits verwendeten Syntheseharze. Als Alternative galt es, eine Polypropylenmembran mit unterschiedlichen Modifikationen zu untersuchen und die Derivatisierung für den Einsatz in der SPOT-Synthese zu optimieren.

2.1.1 Zellulosemembranen; etablierte Träger für Oligomersynthesen

Zellulose ist eines der häufigsten Polymere weltweit. Das fasrige Netzwerk von Polysacchariden besteht aus isotaktischen β -1,4-Polyacetalen von 4-*O*- β -D-Glucopyranosyl-D-glucose. Zellulose ist vollständig inert gegenüber der Behandlung mit typischen Lösungsmitteln der SPOT-Synthese wie DMSO, Wasser, DMF, NMP, und DCM, aber auch gegenüber Toluol und verschiedenen Ethern. Bezüglich vieler Basen ist Zellulose weitgehend stabil, mehrstündige Behandlungen mit methanolischer Natriummethylat-Lösung in hoher Konzentration oder mit konzentrierten Aminen bei erhöhten Temperaturen (70°C und mehr), selbst Mikrowellenbestrahlung, sind möglich. Einige Basen wie Hydrazin-Lösungen hingegen zersetzen Zellulose jedoch, genauso wie Behandlung mit Säuren in Abhängigkeit von Konzentration, Wassergehalt, Temperatur und Zeit.^[90] Die glycosidischen Bindungen der Zellulose werden durch starke Säuren gespalten, so dass es zu einem Verlust der Struktur der Zellulose im Verlauf der Seitenkettenschutzgruppen-Abspaltung in der Peptidsynthese (z.B. 95 % TFA, 5 % Wasser oder DCM) kommen kann. Um dies zu vermeiden, wird auf mechanische Beanspruchung (z.B. Schütteln) und lange Reaktionszeiten (> 1 Stunde) verzichtet.^[45] Die Abspaltung der Seitenschutzgruppen wird in der Regel wiederholt, da unter den trägerbedingten Einschränkungen die Entschützung unvollständig sein kann. Diese Einschränkungen, sowie der Überschuss von ständig präsenten Hydroxylgruppen sind vermutlich dafür verantwortlich, dass Zellulosemembranen in der kombinatorischen Chemie als Trägermaterial weitgehend unüblich sind. Merrifield untersuchte Zellulosegranulat auf die Verwendbarkeit als Träger für die Festphasensynthese von Peptiden bereits 1963.^[24] Seine negativen Ergebnisse sind vermutlich auf die (damals

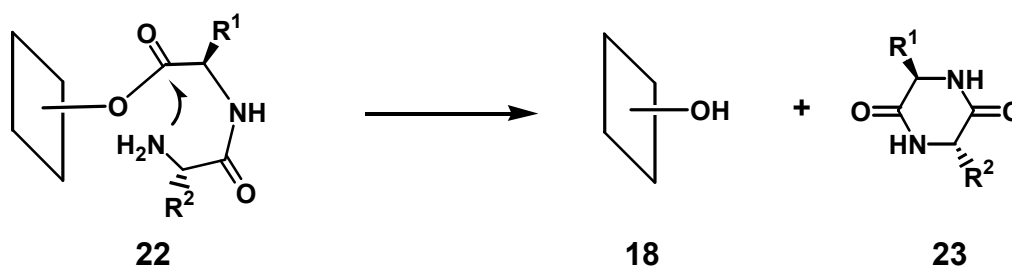
übliche) schwache Aktivierung der Aminosäuren als *p*-Nitrophenylester zurückzuführen, da Zellosescheiben ($\varnothing = 1,5$ cm) 1988 als Harzersatz in Reaktoren erfolgreich zur Peptidsynthese verwendet wurden.^[91] Für die Synthese von Peptiden an grösseren Zellosoberflächen (10 x 14 cm) veresterte Frank die Hydroxylgruppen der Zelloso direkt mit Aminosäuren.^[34] Hierzu inkubierte er vorgetrocknete Zelloso in einer 0,2 M Lösung von Fmoc-geschütztem β -Ala-Anhydrid in DMF unter Zusatz von 1,2 Äq. NMI. Anschliessend wurden die *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppen durch Behandlung der Membran mit einer 20 %-igen Piperidin-Lösung abgespalten (Schema 6). Nach Entfernen des Piperidins wurden auf die getrocknete Zellosoemembran aktivierte Fmoc-Aminosäure-Lösungen pipettiert.



Schema 6: *Aminoderivatisierung der Zellosoemembran 18 durch Veresterung mit 19 nach Frank.*^[34]

Der Derivatisierungsgrad kann direkt durch quantitative Bestimmung der UV-Absorption des Piperidin/DBF-Adduktes ($\epsilon_{301}=8100$)^[92] bei der Fmoc-Abspaltung (*Fmoc-Quantifizierung*) bestimmt werden.

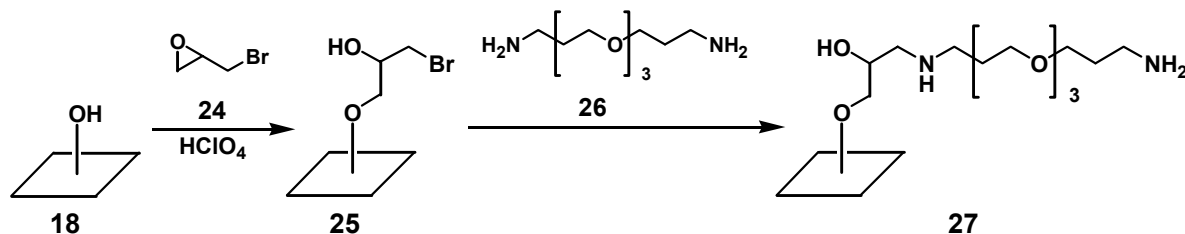
Eine Verankerung von Peptiden oder anderen Substanzen direkt mit den Hydroxylgruppen der Zelloso führt jedoch zu einigen Einschränkungen. So kann die wachsende Peptidkette auf der Dipeptidstufe **22** durch Bildung eines 6-Ringes **23** (Diketopiperazin) unter Spaltung von der Zellosoemembran abgelöst werden (Schema 7).^[93]



Schema 7: *Abspaltung von Peptiden von der Zelloso durch Diketopiperazin-Bildung.*

Eine vorzeitige Spaltung der Esterbindung direkt zur Zelloso während der Synthese unter stark basischen Bedingungen (wie etwa bei der Fmoc-Abspaltung) kann mit einer esterfreien Aminoderivatisierung der Zelloso verhindert werden. Die erste Methode wurde von Volkmer-Engert *et al.* erarbeitet, wobei die Zellosoemembran mit aminogeschützten Epoxiden umgesetzt wurden.^[84] Nach Öffnung des Epoxidringes durch die Hydroxylgruppen erfolgt die Entschützung der Aminogruppe. Hierbei ist eine relativ geringe Aminoderivatisierung im Bereich von 70-85 nmol/cm² ($\cong 7,7$ -9,3 μ mol/g) erreicht worden, verglichen mit typischen Synthescharzen mit Derivatisierungsgraden von 200-1000 μ mol/g.

Einen höheren Derivatisierungsgrad von bis zu $1,5 \mu\text{mol}/\text{cm}^2$ gemessen an der Beladung an Aminofunktionen erreicht man durch eine Alkylierung der Zellulose **18** mit Epibromhydrin **24** im Säuren und anschliessender Bromsubstitution mit einer 1 M Lösung von 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin **26** in DMF (Schema 8)^[52] oder Diaminopropan.^[86]



Schema 8: Optimierte esterfreie Aminoderivatisierung von Zellulosemembranen.^[52]

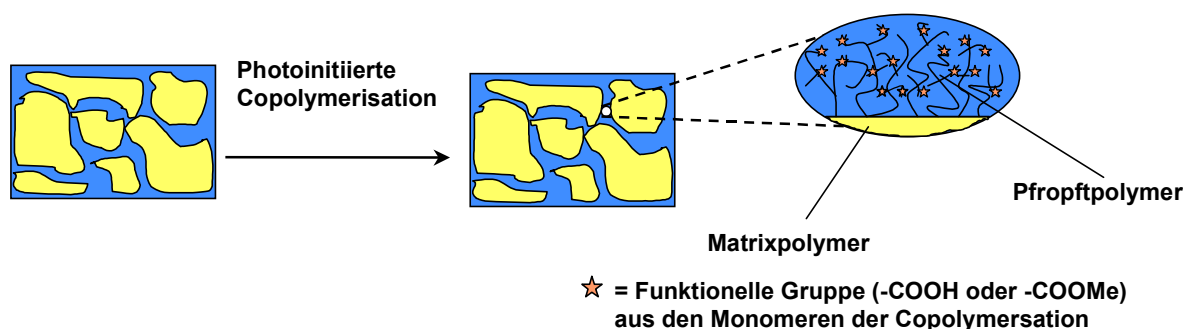
Als Quantifizierung der esterfreien Aminoderivatisierung diente die Umsetzung der erhaltenen Aminogruppen mit Fmoc- β -Ala-OPfp. Hierzu wurden drei SPOTs aus der Zellulosemembran ausgestanzt und mit einer 0,6 M Lösung von Fmoc- β -Ala-OPfp in NMP für eine Stunde inkubiert. Die Vollständigkeit der Acylierung wurde durch Ausbleiben der Blaufärbung mit Bromphenolblau bestätigt. Die SPOTs wurden gewaschen und eine Fmoc-Quantifizierung durchgeführt.

Eine Untersuchung der Homogenität der Derivatisierung wurde bislang noch nicht vorgenommen. Für die Durchführung von z.B. Bindungsassays ist eine homogene Derivatisierung jedoch wichtig. Bei Bindungsassays wird die Stärke der Bindungen eines Proteins an verschiedene Verbindungen an der Zellulosemembran bestimmt. Somit muss sichergestellt werden, dass Unterschiede bei der Bindung nicht auf unterschiedliche Mengen von Zielprodukten an der Membran beruhen. Im Folgenden wurde deswegen die Homogenität an Aminoderivatisierung einer Zellulosemembran bestimmt. Die Quantifizierung wurde an einer $3 \times 5 \text{ cm}$ grossen Membran durch Inkubation mit einer 0,6 M Lösung von Fmoc- β -Ala-OPfp in NMP und anschliessendem Waschen der Membran und Ausstanzen einzelner SPOTs durchgeführt. Das Raster der Auflösung ist bedingt durch die SPOT-Fläche (ca. $0,23 \text{ cm}^2$) zwar recht gross, eine feinere Auflösung kann durch Ausstanzen kleinerer Flächen erreicht werden, vergleichbar der Beladungsunterschiede einzelner Harzkugelgrössen. Die Fmoc-Quantifizierung ergab einen durchschnittlichen Wert von $1470 \text{ nmol}/\text{cm}^2$. Hierbei wurden Schwankungen von ca. 7,5 % um den Mittelwert beobachtet. Dieser Wert ist etwas grösser als der einer Quantifizierung dreier direkt nebeneinander liegender SPOTs. Solche Schwankungen sind für spätere Festphasen- und Lösungs-Assays tolerabel, da bei der Beurteilung der Assays ohnehin Variationen in den chemischen Ausbeuten der einzelnen Produkte bedacht werden müssen.

Die Verwendung von 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin bringt zwei Vorteile mit sich. Zum Einen lassen sich an der erhaltenden Aminofunktion Linker anbringen, dessen Bindungen zur Membran nicht durch starke Basen oder Säuren gespalten werden können. Desweiteren bildet das Diamin einen Abstandshalter (*spacer*) zwischen Zellulose und den zu testenden Substanzen. Somit wird deren sterische Zugänglichkeit für die Proteine während eines Festphasen-Bindungsassays erhöht.^[20]

2.1.2 Polypropylenmembranen; neue Träger in der SPOT-Synthese

Es ist nahezu unmöglich an der Zellulosemembran mit dem inhärenten Überschuss an Hydroxylgruppen selektiv benzyliche oder phenolische Hydroxylgruppen immobilisierter Reagenzien zu alkylieren oder acylieren. Um diesen Nachteil der Zellulosemembranen, und die eingeschränkte Säurestabilität zu umgehen, sollte eine Alternative gefunden werden. Da bereits Synthesen von Peptiden an polymeren Filmen in Reaktoren beschrieben wurden,^[77, 94, 95] fiel die Wahl auf eine Polypropylen-Filtermembran. Im Gegensatz zu einer bereits durch die Hydroxylgruppen funktionalisierte Zellulosemembran musste an dieser PP-Membran eine Funktionalisierung erst erzeugt werden. Eine Funktionalisierung von PP-Pellets wurde durch Oxidation der Oberfläche mittels Crom(III)-Oxid zur Carbonsäure erreicht.^[96] Eine Alternative stellt die „Pfropf-Polymerisation“ dar, bei der unter radioaktiver^[97] oder UV-Bestrahlung^[98] ein zweites Polymer auf dem Basispolymer aufgebracht wird. Die Initiierung der Polymerisation unter UV-Bestrahlung ist aufgrund der einfacheren und ungefährlicheren Arbeit von Vorteil. Hierfür wird die PP-Membran in einer Lösung von Benzophenon und Pfropfmonomer behandelt. Benzophenon dient unter UV-Bestrahlung als Radikalstarter und initiiert eine Polymerisation ausgehend von der PP-Oberfläche, allerdings erfolgt die Polymerisation zum Teil auch in Lösung. Die in Lösung gebildeten Homopolymere können durch Waschen entfernt werden. An den Fasern der PP-Membran verbleiben die kovalent gebundenen Copolymerstränge (Schema 9).



Schema 9: Aufbringen eines funktionalisierten Pfropfpolymeres an den Fasern der PP-Membran durch photoinitiierte Copolymerisation.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden derivatisierte Filtermembranen der Firma Millipore verwendet, die von der Firma PolyAn GmbH durch photoinitiierte Copolymerisation modifiziert wurden. Dies gelang durch die Aufpolymerisation von Acrylsäure und Acrylsäuremethylester mittels photoinitiiertem „Pfropf-Polymerisation“. Die erhaltenen kovalent gebundenen Polymerstränge verringern die Hydrophobizität der Membranoberfläche, was für Tests mit Proteinen in wässrigen Puffersystemen von Vorteil ist, da so ein unspezifisches Binden der Proteine minimiert wird. Zur gravimetrischen Bestimmung des Derivatisierungsgrades wurde die PP-Membran mit Methanol und *n*-Hexan extrahiert, getrocknet und gewogen. Nach der Copolymerisation wurde die Membran erneut extrahiert, um anhaftendes Homopolymer aus den Acrylbausteinen zu entfernen, getrocknet und gewogen. Aus dem Massenzuwachs ergibt sich ein mittlerer Derivatisierungsgrad des eingesetzten Monomerbausteins, wobei bis zu 10 $\mu\text{mol pro cm}^2$ erreicht werden können.^[83, 99] Dieser Deckungsgrad ist kein direktes Mass für den Abstand der funktionellen Gruppen pro Fläche, da die gemittelte Funktionalitätsdichte nicht von der Länge der Acrylketten auf der Oberfläche abhängt. Sie wird lediglich rein rechnerisch aus der Bestimmung einer kompletten Membran mit der Grösse von ca. 22 x 32 cm ermittelt. Die

Funktionalitätsdichte liefert keinerlei Aussage über die Homogenität der Funktionalisierung einer gegebenen Fläche (Abb. 5). Eine entsprechende Untersuchung der Homogenität der Derivatisierung der Oberflächen konnte an dieser Stelle nicht durchgeführt werden.

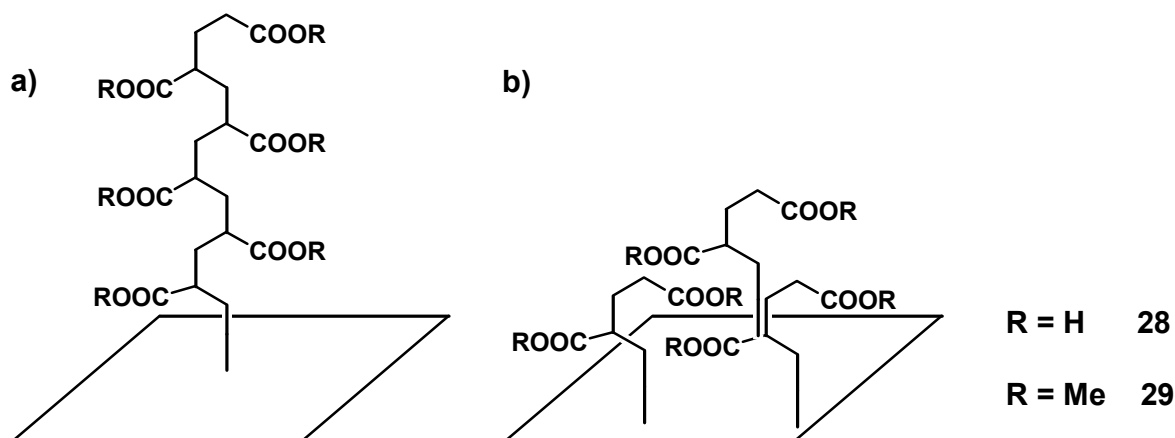
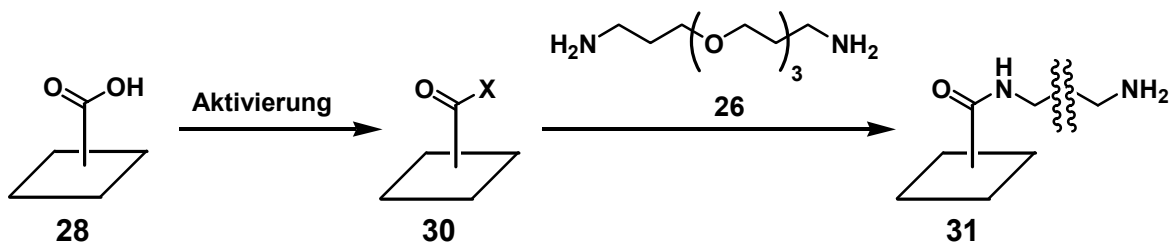


Abb. 5: Mögliche Realisierungen einer gravimetrisch bestimmten Beladung von sechs Acrylsäuremolekülen pro Flächeneinheit. Im Fall a) würde eine geringere Homogenität pro Flächeneinheit erreicht als bei der gleichmäßigeren Reaktion im Fall b).

Um eine unter den späteren Synthesebedingungen stabile Verankerung der Linkersysteme zu gewährleisten war eine Aminofunktionalisierung der PP-Membranen notwendig. Diese sollte durch Umsetzung der derivatisierten PP-Filtermembranen **28** und **29** mit einem geeigneten Diamin erreicht werden. Zuerst wurde die Aktivierung der Carboxylgruppe der Carbonsäure-Derivatisierung, mit anschließender Umsetzung mit 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin **26** als Spacermolekül untersucht (Schema 10).



Schema 10: Umsetzung der carbonsäure- zu einer aminoderivatisierten PP-Membran **31**.

Zur Bestimmung der optimalen Kombination aus Aktivierungsreagenz, Konzentration und Zeit wurden DIN-A4-grosse säurefunktionalisierte PP-Membranen mit einer gravimetrisch bestimmten Beladung von 4 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ zerteilt und unter verschiedenen Bedingungen umgesetzt (Tabelle 1). Die aktivierten Carbonsäurederivate **30** wurden mit einer 5 M Lösung von **26** in DCM zur Reaktion gebracht und die erhaltenen Aminogruppen mit Fmoc- β -Ala-OPfp acyliert.

Tabelle 1: Aminoderivatisierung der säurederivatisierten PP-Membran **28** nach verschiedenen Aktivierungsbedingungen zu **30** und Reaktion mit **26**.

Nr.	Aktivierungs- reagenz	Konzentration [M]	Zeit [min]	Aminoderivatisierung [nmol/cm ²] ^a
1	DIC/HOBt	1 in NMP	30	43±5
2	DIC/PfpOH	1 in NMP	60	107±5
3	SOCl ₂	2 in DCM	60	32±6
4	SOCl ₂	4 in DCM	120	46±5
5	(COCl) ₂	2 in DCM	120	193±5
6	(COCl) ₂ /DMF	2 in DCM	120	223±5
7	CO(OCCl ₃) ₂	1 in DCM	120	121±5
8	PCl ₃	2 in DCM	60	108±8
9	PCl ₅	2 in DCM	60	296±8
10	PCl ₅	2 in DCM	120	561±10

^a Mittelwert aus sechs Fmoc-Quantifizierungen nach Umsetzung mit Fmoc-β-Ala-OPfp

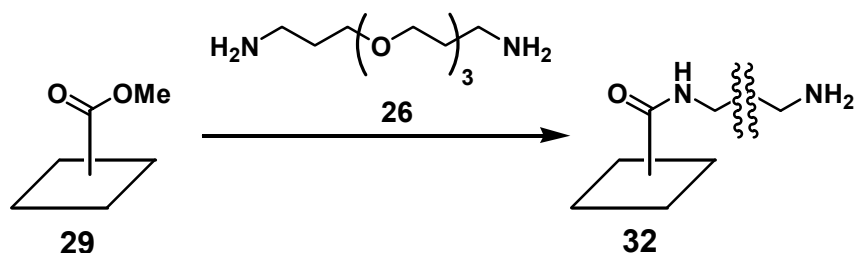
Die Ausbeuten der Aminoderivatisierung der PP-Membran lagen, bezogen auf die gravimetrische Bestimmung der Beladung, bei max. 15 % (Nr. 10). Die Beladung an Aminofunktionen wurde in allen Fällen durch Fmoc-Quantifizierung als Summenausbeute nach Aktivierung, Umsetzung mit Diamin **26** und Acylierung mit Fmoc-β-Ala-OPfp bestimmt. Eine Aufschlüsselung an aktivierungsspezifischen Nebenreaktionen, wie etwa die unterschiedliche Hydrolysegeschwindigkeit der Pentafluorphenol-Aktivester (Nr. 2) und der Aktivierung über das Säurechlorid (Nr. 3-10), wurde nicht vorgenommen, da letztendlich ein möglichst hoher Umsatz von Säure zum Amid, gemessen an maximaler Aminofunktionalisierung, erreicht werden sollte. Die als Nebenreaktion auftretende Quervernetzung durch die Aminolyse von zwei aktivierten Carbonylgruppen durch die beiden Aminogruppen eines 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiaminmoleküls konnte in keinem der Fälle untersucht werden. Die Aktivierung zum entsprechenden Säurechlorid mit PCl₅ stellte sich als effektivste Methode (Nr. 8-10) heraus. Auf eine längere Aktivierung als zwei Stunden wurde verzichtet, um eine Hydrolyse bereits entstandener Säurechloride zu vermeiden.

Bei der Übertragung der Ergebnisse auf andere carbonsäurefunktionalisierte PP-Membranen mit unterschiedlichen Ausgangsderivatisierungsgraden von 1 bis 10 μmol/cm² wurden ebenfalls nur Ausbeuten an Aminofunktionalisierung von 10-20 % erreicht. Im allgemeinen kann diese relativ geringe Ausbeute an unvollständigen Umsetzungen zur Aktivspezies, Reaktion mit dem Diamin oder einer Quervernetzung durch das Diamin gelegen haben. Darüberhinaus besteht die Möglichkeit, dass nicht alle Carbonsäuren sterisch zugänglich sind. Insgesamt war die erzielbare Ausbeute jedoch ausreichend, um genügend Substanz für Analytik und Screening von einem SPOT zu erhalten.

Die Homogenität der Aminoderivatisierung der Membran wurde mittels Fmoc-Quantifizierung einzelner SPOTs bestimmt. Hierzu wurde eine 3 x 5 cm grosse, mit einer Ausgangsderivatisierungsgraden von 2 μmol/cm² verwendet. Diese Membran wurde mittels

PCl_5 -aktivierte und anschliessend die aminoderivatisierte PP-Filtermembran durch Behandlung mit einer 0,6 M Fmoc- β -Ala-OPfp Lösung in NMP vollständig acyliert. Nach Waschen der Membran wurden 13 SPOTs ausgestanzt. Abspaltung der Fmoc-Gruppe und Messung der UV-Absorption des Piperidin/DBF-Addukts lieferten Werte an Aminoderivatisierung von durchschnittlich 382 nmol/cm^2 , wobei zwei maximale Werte von $420 \pm 5 \text{ nmol/cm}^2$ und drei minimale Werte von $352 \pm 5 \text{ nmol/cm}^2$ erhalten wurden. Die restlichen acht Werte streuten um weniger als drei Prozent um den Mittelwert, was vorangegangene Beobachtungen (Abweichungen der Werte vgl. Tabelle 1) bei der Quantifizierung von Derivatisierungsgraden entsprach. Die Schwankungen liegen mit zehn Prozent im Bereich derer der Zellulose (vgl. Kapitel 2.1.1).

Die methylestermodifizierte PP-Membran **29** sollte durch Aminolyse mit dem Diamin **26** ebenfalls in eine aminoderivatisierte Membran **32** überführt werden (Schema 11).



Schema 11: Umsetzung einer methylester- zu einer aminoderivatisierten PP-Membran **32**.

Hierzu mussten verschiedene Bedingungen untersucht werden, um eine möglichst effiziente Methode in Hinblick auf Ausbeute, Zeit und Reagenzieneinsatz zu finden. Eine DIN-A4-grosse methylestermodifizierte PP-Membranen wurde in 8 Teile zerschnitten und jeder Teil wurde einer verschiedenen Aminolysezeit und -temperatur ausgesetzt sowie mit verschiedenen Konzentrationen an **26** behandelt. Die Teile der Membran wurden so gewählt, dass sich sechs SPOTs aus der Mitte ausstanzen liessen, um Inhomogenitäten während der Reaktionsführung auszumitteln (Tabelle 2).

Tabelle 2: Aminolysebedingungen der methylesterfunktionalisierten PP-Membranen **29** mit dem Diamin **26** und resultierende Aminoderivatisierung.

Nr.	Konzentration an Diamin 26	Temperatur [°C]	Zeit [h]	Aminoderivatisierung [nmol/cm ²] ^a
1	1 [M] in NMP	25	1	11±5
2	1 [M] in NMP	80	1	43±5
3	1 [M] in NMP	80	8	107±5
4	2 [M] in NMP	80	8	122±6
5	Pur	80	8	178±6
6	Pur	80	24	263±5
7	Pur	100	48	341±5
8	Pur	100	72	481±6

^a Mittelwert aus 6 Fmoc-Quantifizierung nach Umsetzung mit Fmoc- β -Ala-OPfp

Zur Quantifizierung der Aminolyse wurde erneut die Umsetzung der erhaltenen Aminogruppen mit Fmoc- β -Ala-OPfp und anschliessender Fmoc-Quantifizierung (wie sie bereits an der Zellulose- und der anderen PP-Membran durchgeführt wurden) eingesetzt. Die Optimierung der Aminolyse ergab, dass hohe Temperaturen und Konzentrationen an Diamin nötig sind, um eine maximale Aminoderivatisierung der Membran zu erreichen. Allerdings konnte selbst nach drei Tagen bei 100°C (Nr. 8) nicht der Derivatisierungsgrad an Aminogruppen erreicht werden, der nach der gravimetrischen Bestimmung der Copolymerisation zu erwarten wäre (ca. 4 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$). Eine längere Umsetzung mit 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin **26** wurde nicht vorgenommen, da die PP-Membran bereits eine Gelbfärbung zeigte, die sich auch durch intensives Behandeln mit verschiedenen Lösungsmitteln nicht entfernen liess.

Die geringe Ausbeute an Aminoderivatisierung (ca. 12 %) kann mehrere Gründe haben. Die gravimetrische Beladung kann als zu hoch bestimmt worden sein, z.B. durch anhaftende nicht kovalent gebundene Polyacrylmethylester-Stränge. Ferner können die dicht an der Membranoberfläche befindlichen Methylester sterisch derart abgeschirmt sein, dass diese nicht mit dem Diamin reagieren. Schliesslich kann es auch an der Bestimmung der Aminoderivatisierung liegen. So liefert die Fmoc-Quantifizierung lediglich die Summe der verfügbaren Aminogruppen nach der Aminolyse. Die als Nebenreaktion auftretende Quervernetzung durch die Aminolyse von zwei Methylestergruppen durch die beiden Aminogruppen eines 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiaminmoleküls kann so allerdings nicht nachgewiesen werden. Ferner kann es zur basischen Verseifung der Methylester durch Spuren von Wasser in/auf der PP-Membran oder im 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin kommen. Da mit der Methode jedoch eine für weitere Synthesen ausreichende Aminoderivatisierung erreicht werden konnte, wurden die Bedingungen der Aminolyse nicht weiter optimiert.

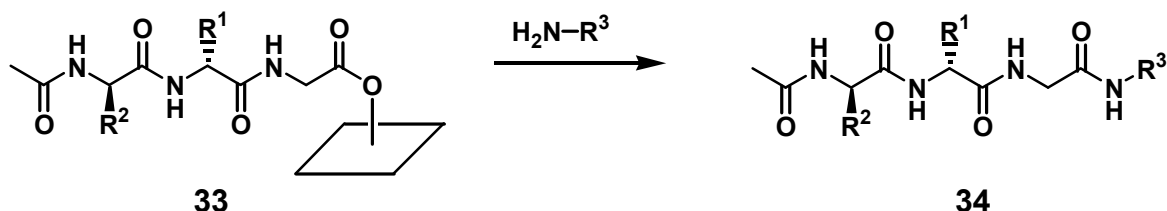
2.2 Linkersysteme für die SPOT-Synthese

Als Linkersysteme werden funktionelle Gruppen oder bifunktionelle Moleküle bezeichnet, die die Aufgabe haben, das Zielmolekül während der einzelnen Syntheseschritte an der polymeren Oberfläche zu immobilisieren. Die Bindung zwischen Substrat und Träger muss so beschaffen sein, dass sie alle trägergebundenen Syntheseschritte unbeschadet übersteht, nach beendeter Synthese jedoch quantitativ gespalten werden kann, ohne dass die synthetisierte Verbindung dabei Schaden nimmt. Es wurden eine Vielzahl verschiedener Linkersysteme entwickelt,^[100, 101] die sich durch die unterschiedlichsten, manchmal sehr speziellen, Bedingungen spalten lassen.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit, Bedingungen zur Verwendung der SPOT-Synthese für die Darstellung kombinatorischer [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken zu finden und diese zu optimieren, erfordert mindestens ein Linkersystem, welches die oben genannten Bedingungen erfüllt. Ein Repertoire an sowohl basen-, säure- und photolabilen Linkern sollte getestet werden, um ggf. die einzelnen Vor- und Nachteile für die Darstellung von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken zu evaluieren.

2.2.1 Basisch spaltbare Linkersysteme

Durch die Veresterung der Hydroxylgruppen der Zellulose mit aktivierten Aminosäuren wurde gleichzeitig ein basisch spaltbares Linkersystem erzeugt. Dieser so erhaltende Ester-Linker wird häufig in der SPOT-Synthese von Peptiden eingesetzt.^[34, 36, 42, 45, 102] Es hat es sich als zweckmässig erwiesen, die ganze Zellulosemembran durch Veresterung mit einer Aminosäure zu derivatisieren.^[34, 36] Hierbei erfolgt die Aktivierung der Aminosäurederivate durch DIC und NMI zum entsprechenden Anhydrid. Mit der Verwendung von Fmoc-geschütztem Glycin sind Beladungen von bis zu 2000 nmol/cm² realisierbar. Durch optimierte SPOT-Synthese-Bedingungen sind 10-15-mere Peptide an Zellulosemembranen mit Reinheiten von 60 bis über 85% erreichbar.^[45, 103] Dies zeigt, dass der Ester-Linker gut für die Synthese von Peptiden an Zellulose geeignet ist. Ein weiterer Vorteil dieses Linkers ist es, dass der C-Terminus des Peptides **33** nach der Synthese, während der Abspaltung modifiziert werden kann. In Abhängigkeit davon, welches Amin zur Spaltung der Esterbindung verwendet wird, können C-terminale unterschiedliche (Alkyl-) Amide **34** erhalten werden (Schema 12).



Schema 12: *Spaltung der Esterbindung durch verschiedene Amine.*^[104]

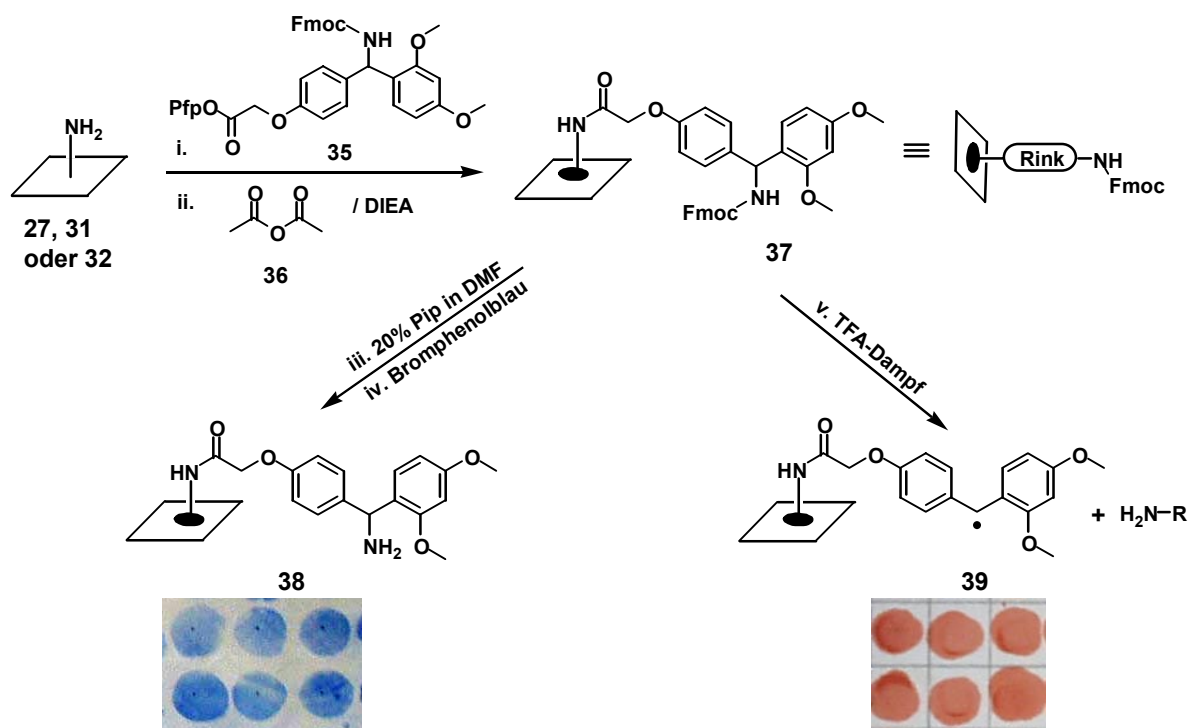
Die Abspaltung kann sowohl in Lösung, als auch in der Gasphase, also z.B. mit einem möglichst flüchtigem Amin, erfolgen.^[104, 105] Die Vorteile der Gasphasen-Abspaltung liegen zum einem im Erhalt der örtlichen Adressierbarkeit der synthetisierten Verbindungen und zum anderen im leichteren Entfernen des Abspaltreagenzes, da geringere Mengen verwendet werden. Die notwendige Einwirkzeit des Amines für eine möglichst vollständige Spaltung hängt nicht nur von der jeweiligen Nucleophilie ab, sondern auch ganz entscheidend vom Dampfdruck.

Die Esterbindung schränkt die Auswahl von Aminen bei der S_NAr an membrangebundenen Dichlor-[1,3,5]-triazinen allerdings ein, da hier kleine, sehr nucleophile Amine als Nebenreaktion das (Ziel-)Molekül von der Zellulose abspalten können. Bei einer beabsichtigten gleichzeitigen Substitution und Abspaltung eröffnet sich jedoch ein Anwendungsgebiet dieses Linkers. Für einen allgemeineren Einsatz sollten jedoch weitere Linkersysteme untersucht werden.

2.2.2 Sauer spaltbare Linkersysteme

Im Gegensatz zu den basenlabilen Ester-Linkern sind säurelabile Linker wie der Rink-Amid-Linker^[106] (im Folgenden kurz Rink-Linker) vollkommen stabil gegenüber Nucleophilen, die zur Substitution der Chloratome des membrangebundenen Dichlor-[1,3,5]-triazins eingesetzt werden sollen. Der Rink-Linker konnte mit guten Ausbeuten, bezogen auf die Fmoc-Quantifizierung, sowohl an die aminoderivatisierte Zellulose-

membran, als auch an die aminofunktionalisierten PP-Membranen gekoppelt werden. Eine Aktivierung der {4-[(2,4-Dimethoxy-phenyl)-(9H-fluoren-9-ylmethoxy-carbonylamino)-methyl]-phenoxy}-essigsäure zum entsprechenden Pentafluorphenylester **35** durch Umsetzung mit Pentafluorphenol und DIC ohne Zusatz von Base erwies sich als besonders günstig, da die Reaktion direkt in NMP erfolgen kann. Auf Zusatz von Base musste verzichtet werden, um im Fall der Zellulosemembran eine Acylierung der Hydroxylgruppen zu vermeiden. Die so erhaltene Lösung von **35** (max. Konzentration 0,3 M) ist ohne signifikanten Aktivitätsverlust eine Woche verwendbar, falls sie zwischen dem Gebrauch eingefroren wird. Vor dem ersten SPOT-Schritt wurde mit einem Bleistift ein 1 x 1 cm Raster auf die Zellulose oder PP-Membran gezeichnet. Dies ist notwendig, um nach Syntheseschritten und Waschprozeduren die Position der Verbindungen (also der SPOTs) auf der Oberfläche wiederzufinden. Als ideales SPOT-Volumen haben sich 2 µl auf der Zellulose- und 1 µl auf der PP-Membran erwiesen, um die Fläche eines SPOTs (0,23 cm², Ø ≈ 0,5 mm) ausreichend zu tränken. Hierbei wurde darauf geachtet, dass eine geringfügig grössere Fläche benetzt wird, als eigentlich notwendig ist. Somit wird sicher gestellt, dass auch die Randbereiche der SPOTs ausreichend mit Reagenz benetzt werden. Nach der Kopplung des Rink-Linkers werden nicht erreichte Aminogruppen z.B. zwischen den SPOTs mit Essigsäureanhydrid acetyliert (*capping*), um so nur die Aminogruppen der SPOTs nach der Fmoc-Abspaltung anzufärben und die SPOTs „sichtbar“ zu machen (Schema 13).



Schema 13: *Acylierung von aminoderivatisierten planaren Oberflächen mit aktiviertem Rink-Linker. Nach Acetylierung der nicht umgesetzten Aminofunktionen mit Acetanhydrid und Entschützen der N-Termini können die SPOTs mit Bromphenolblau angefärbt werden (38). Nach beendeter Synthese werden die Produkte mittels TFA-Dampf von dem Träger gespalten, wobei die roten Rink-Radikale die Position der adhäsiv gebundenen Verbindungen anzeigen (39).*

Die Abspaltung der Verbindungen vom Rink-Linker an Synthescharzen erfolgt üblicherweise mit einer 50 bis 95 %-igen TFA-Lösung in DCM innerhalb von ein bis zwei Stunden.^[100, 106] Bei der Verwendung des Rink-Linkers an planaren Oberflächen ist jedoch

eine Abspaltung unter Erhalt der örtlichen Adressierbarkeit möglich. Analog zur Spaltung der Esterbindung mit gasförmigen Aminen bei basenlabilen Linkern, kann hier eine Abspaltung mit TFA-Dampf erfolgen. Hierzu werden die Zellulose- oder PP-Membranen mit dem Rink-Linker zur Abspaltung der Syntheseprodukte unter Erhalt der örtlichen Adressierbarkeit in einen mit TFA-Dampf gesättigten Exsikkator legen. Das Erscheinen des roten Rink-Radikales zeigt nicht nur den Spaltungsvorgang an, sondern ermöglicht auch ein einfach „wiederfinden“ der nun lediglich adhäsiv gebundenen Produkte (Schema 13). Die SPOTs werden z.B. in Mikrotiterplatten ausgestanzt, die adhäsiv am Träger gebundenen Substanzen mit einem Gemisch aus Wasser:Acetonitril (1:1) abgelöst und mittels HPLC-MS-Technik analysiert. Die Vollständigkeit der Spaltung des Rink-Linkers unter den relativ milden Bedingungen innerhalb von 30 min wurde durch Waschen der SPOTs und erneuter Abspaltung mit 95 %-iger TFA Lösung in DCM für zwei Stunden überprüft. Nach Entfernen der TFA wurde kein Zielprodukt (in diesem Fall *N*-acyl Phe-Phe-Leu **40**) mehr detektiert. Die Vollständigkeit der Gasphasen-Abspaltung konnte somit nachgewiesen werden (vgl. Abb. 6).

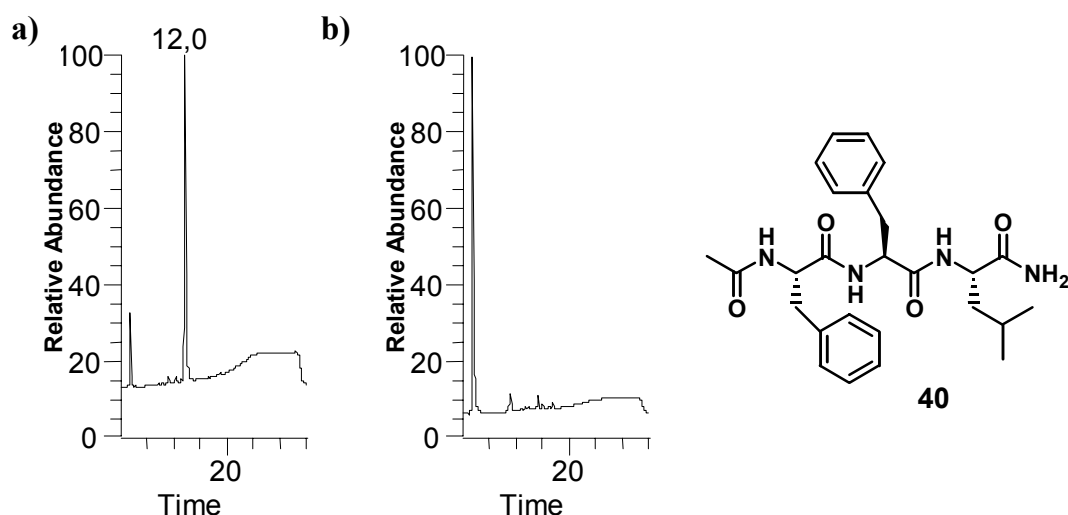
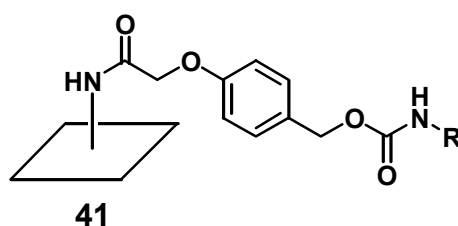


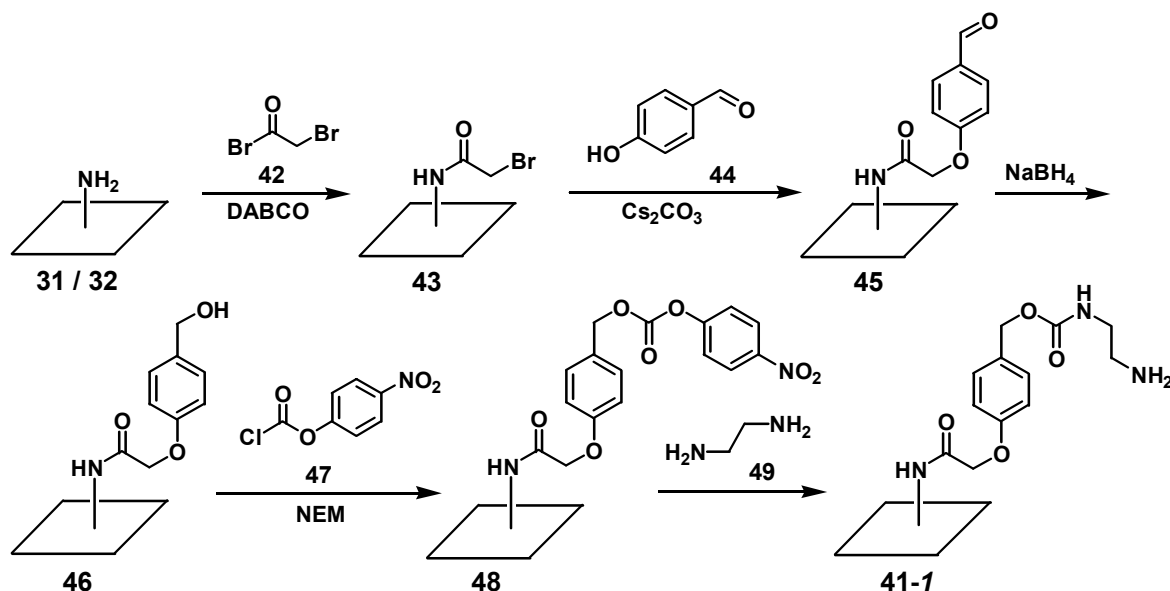
Abb. 6: HPLC-Spur nach TFA-Dampf-Abspaltung und Ablösen mit Wasser:Acetonitril von **40** an der Zellulosemembran (a) und anschließender Nachspaltung der selben Membran mit flüssiger TFA (b) zur Überprüfung der Vollständigkeit.

Die chemisch und physikalisch robusteren PP-Membran ermöglichte zusätzlich die Verwendung eines Carbamatlinkers. Dieser Linker erlaubt den Einsatz von bifunktionalen Bausteinen wie Diaminen und liefert somit Zugang zu Strukturen, die mit dem Einsatz des Rink-Linkers nicht erhalten werden können.



Die Synthese von **41** erfolgte in Anlehnung an die Darstellung am Syntheseharz von Ho *et al.*^[107] Dazu musste an der PP-Membran der *p*-Alkoxy-Benzylalkohol („Wang-Linker“^[108])

erst synthetisiert werden (Schema 14). Hierzu wurde zunächst eine aminoderivatisierte PP-Membran mit Bromessigsäurebromid **42** (2 M in DCM) und DABCO (0,3 Äq.) acyliert. Die erhaltende Bromfunktion wurde mit einer ca. 4 M Lösung des Cäsiumsalzes von *p*-Hydroxybenzaldehyd (zugänglich aus Cäsiumcarbonat und *p*-Hydroxybenzaldehyd **44** in wässrigem DMSO durch Erhitzen auf 80°C) substituiert. Die Reduktion des membrangebundenen Aldehyds **45** erfolgte mit Natriumcyanoborhydrid in Methanol. Man erhält eine Wang-Linker modifizierte PP-Membran **46**. Zur Darstellung des Aktiv-Carbonates wurde diese Membran in einer 1 M Lösung von *p*-Nitrochloroformiat **47** in DCM mit 0,1 Äq. NEM 90 min behandelt. Um eine vollständige Umsetzung zu gewährleisten, wurde die Prozedur wiederholt. Für die anschließende Umsetzung zum membrangebundenen Carbamat wurde als erstes Ethylendiamin (50 %-igen-Lösung in DMF (v/v) für 4 Stunden) wegen seiner hohen Reaktivität gewählt. Ethylendiamin **49** sollte aufgrund der kurzen Alkylkette nur bedingt in der Lage zur Quervernetzung (also der Reaktion beider Aminogruppen mit zwei Carbonaten) sein, ferner lässt es sich in hohen Konzentrationen in DMF oder NMP einsetzen, was zusätzlich eine mögliche Quervernetzung unterdrücken sollte (Schema 14).



Schema 14: Darstellung des Carbamatlinkers **41-1** an PP-Membranen.

Eine Optimierung dieser Reaktionssequenz erwies sich als besonders schwierig, da die Ausbeuten der einzelnen Schritte nicht direkt bestimmt werden konnten. Ein ungefähres Mass über die Gesamtausbeute lieferte lediglich das Verhältnis von Fmoc-Quantifizierung der eingesetzten aminoderivatisierten PP-Membran und der am Ende, durch Umsatz des *p*-Nitro-Carbonates **48** mit Ethylendiamin, zur Verfügung stehenden Aminogruppen. Gemessen an einer Fmoc-Quantifizierung führten längere Reaktionszeiten als vier Stunden des aktivierten Carbonates mit Ethylendiamin zu keiner erhöhten Amino-Carbamat-Funktionalisierung. Nach Acylierung der freien Aminogruppen mit Fmoc- β -Ala-OPfp und Fmoc-Quantifizierung konnte eine Beladung von ca. 55 % der Ausgangsbeladung der PP-Membran an Aminogruppen erreicht werden. Dies entspricht einer durchschnittlichen Ausbeute von 92 % pro Reaktionsschritt. In Anbetracht der recht guten Ausbeuten wurde von einer Optimierung der Reaktionsbedingungen abgesehen.

Zur Erhöhung der Diversität wurden insgesamt zehn verschiedene Diamine zur Reaktion mit dem aktivierten Carbonat **48** gebracht. Die Ausbeuten wurden wie zuvor durch Umsetzung der membrangebundenen Aminogruppen mit 0,6 M Lösung von Fmoc- β -Ala-OPfp in NMP und anschließender Fmoc-Quantifizierung bestimmt. Die Bedingungen und

Ergebnisse dieser Reaktionen sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Ausbeuten entsprechen den Mittelwerten aus sechs Messungen pro eingesetztem Diamin.

Tabelle 3: Untersuchungen zur Einsatzmöglichkeit verschiedener Diamine für die Darstellung eines Carbamatlinkers **41**.

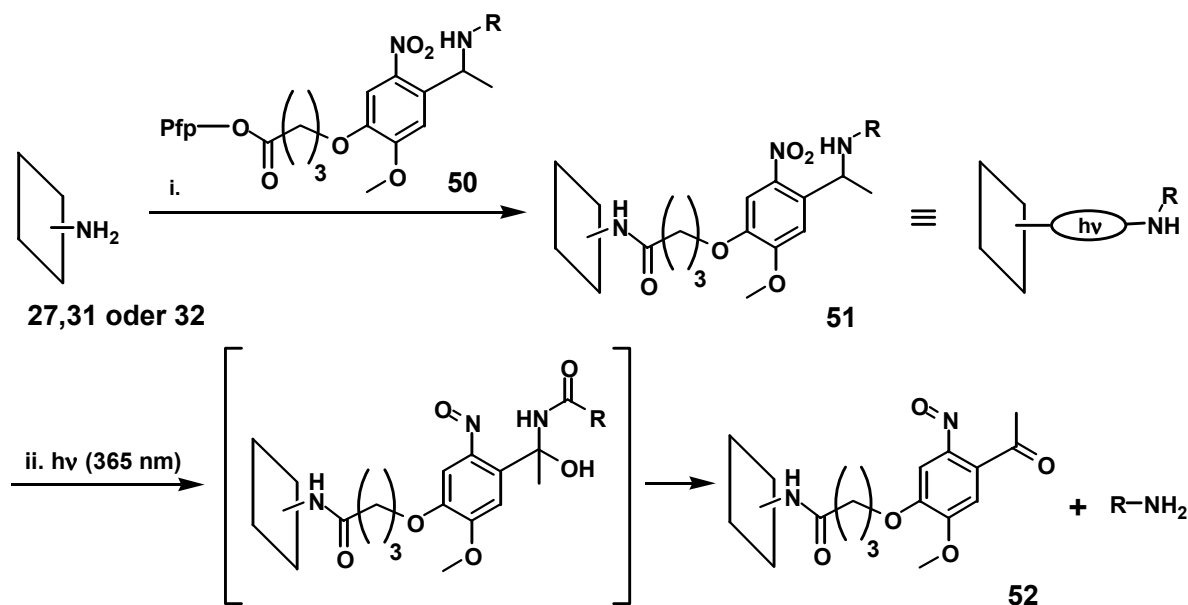
Nr.	Diamin	Konzentration [M] in NMP	Zeit [h]	Temperatur [°C]	Ausbeute ^a [%]
41-1	Ethylendiamin	5	4	50	55
41-2	1,3-Diaminopropan	5	4	50	53
41-3	1,4-Diaminobutan	5	4	80	59
41-4	1,5-Diaminopentan	3	4	80	50
41-5	1,6-Diaminohexan	3	4	80	50
41-6	Piperazin	2	4	80	56
41-7	<i>N,N'</i> -Dimethylethylendiamin	5	4	60	56
41-8	<i>N,N'</i> -Dibenzylethylendiamin	5	4	60	40
41-9	α,α' -Diamino- <i>p</i> -xylol	2	4	80	44
41-10	<i>trans</i> -1,2-Diaminocyclohexan	3	6	80	47

^a bezogen auf Aminofunktionalisierung der PP-Membran; Mittelwert aus 6 Messungen

Die Ausbeuten an Aminoderivatisierung bei den eingesetzten Diaminen entsprachen der zuvor für das Ethylendiamin erhaltenden. Bezogen auf die Ausgangsbeladung der Membran verlief die Umsetzung zu **41-8** mit *N,N'*-Dibenzylethylendiamin mit der geringsten Ausbeute. Eine Erklärung könnte der sterische Anspruch der Benzylgruppen sein. Die restlichen Amine lieferten gute Ergebnisse, so dass sie zur Erhöhung der Diversität in den Synthesen von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken eingesetzt werden können.

2.2.3 Photolytisch spaltbare Linkersysteme

Photolabile Linker zeichnen sich durch eine besondere Orthogonalität zu einer Vielzahl von Synthesoperationen aus.^[109-111] Dies ist von besonderer Bedeutung bei Synthesen in deren Verlauf es sowohl zu stark basischen (z.B. beim Einsatz von Aminen zur nucleophilen Substitution) als auch sauren (z. B. bei der Verwendung von TFA zur Schutzgruppen-Abspaltung) Bedingungen kommt. Für diese Zwecke haben sich *ortho*-Nitro-Benzyllderivate, wie der von Holmes *et al.*^[112-114] optimierte Linker, als besonders geeignet erwiesen, da die Nitrogruppen durch gezielte UV-Bestrahlung oxidiert werden können und dann in einer Radikalkaskadenreaktion die Benzylstellung oxidieren. Daraufhin kommt es zu einer Abspaltung der Amidkomponente an der aromatenabgewandten Benzylposition (Schema 15).



Schema 15: Immobilisierung des photolabilen Linkers **50** und Spaltungsmechanismus unter Bestrahlung bei 365 nm in Anlehnung an Pillai et al.^[115]

Der 5-Nitrophenoxy-Linker modifizierte Zellulosemembran **51a** (Schema 15) wurde bereits in der SPOT-Synthese eingesetzt.^[52] In Versuchen zur lösungsmittelfreien Spaltung des Linkers („Photolinker“) unter Wahrung der Ortsadressierung der Substanzen zeigte sich die hervorragende Eignung des Linkers für die SPOT-Synthese. Bei Bestrahlung der gesamten Membran auf einen UV-Leuchttisch bei einer Lichtenergie von 7 mW/cm² ist die Abspaltung nach 90-100 Minuten für Membranen mit niedriger Beladung (ca. 100 nmol/cm²) abgeschlossen.^[52] Bei höher beladenen Membranen von ca. 400 nmol/cm² bedarf es einer deutlich verlängerten Abspaltzeit von ca. 180 min pro Membranseite bei Anwesenheit von [1,3,5]-Triazinresten im Zielmolekül (Abb. 7).

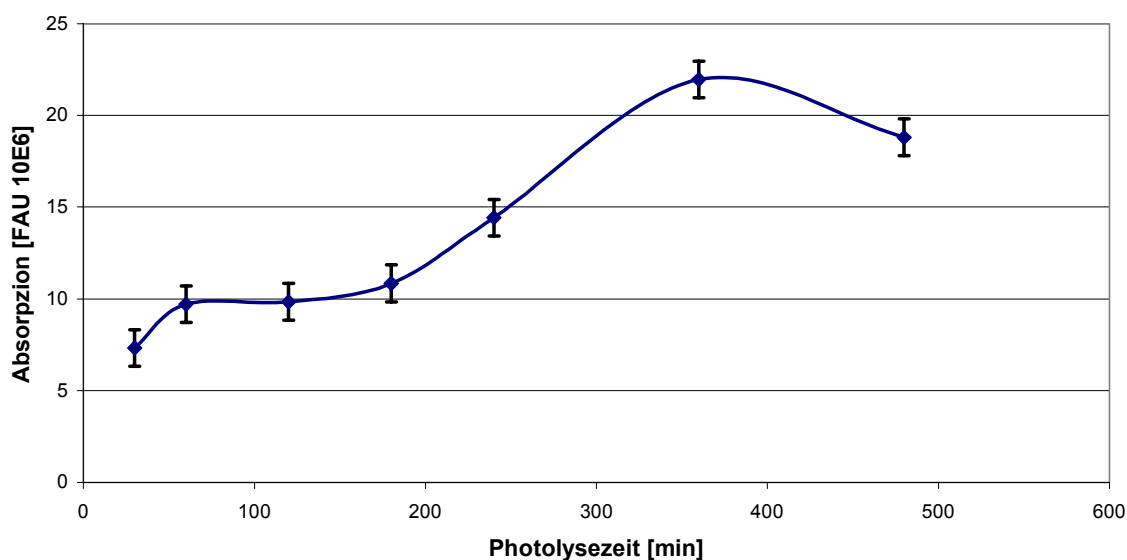


Abb. 7: Abspaltungskinetik des Photolinkers an einer Zellulosemembran **27** (Beladung von 380 nmol/cm²). Die abgespaltene Menge an 2,4,6-Triamino-[1,3,5]-triazin in Abhängigkeit von der Photolysezeit bei 365 nm wurde HPLC-chromatographisch bei 220 nm durch Vergleich mit Werten einer Eichkurve (vgl. Kapitel 2.3) bestimmt.

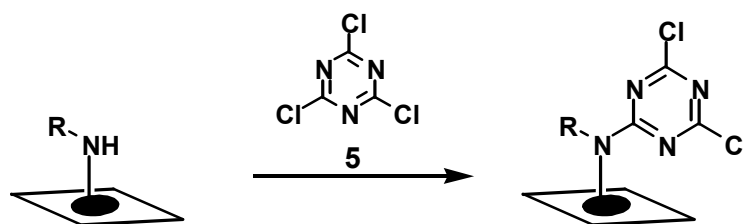
Das Plateau der abgespaltenen Menge zwischen ca. 60 und 180 min kann auf die starke UV-Absorption des Nitrosoaromaten **52** und die daraus resultierende Abschirmung der noch an die Membran gebundener Substanzen zurückzuführen sein. Darüberhinaus besitzen die im „inneren“ der Zellulose verborgenen Linkermoleküle vermutlich eine langsamere Spaltungskinetik. Falls es nach ca. 180 min zu einer Zersetzung der entstandenen Nitrosoderivat kommt, können die „inneren“-Linkermoleküle gespalten werden. Der Abfall an abgespaltenen Produkt nach 400 min lässt sich durch ein auftretendes Nebenprodukt, vermutlich aus Zersetzung bereits abgespaltener [1,3,5]-Triazine, durch die andauernde Bestrahlung, erklären. Es war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich, die Art der Zersetzung bzw. das/die entstehende(n) Produkt(e) aufzuklären.

Ein genereller Nachteil des Photolinkers ist seine Lichtempfindlichkeit im Verlauf der Synthese. So kommt es zu unbeabsichtigter Abspaltung der Produkte, sobald man direktes Licht nicht völlig vermeidet. Gerade in der SPOT-Synthese, wo es darauf ankommt bestimmte Positionen punktgenau auf einer planaren Oberfläche in den einzelnen Synthesecyclen wieder und wieder mit Reagenzien zu benetzen, stellt dies mitunter ein Problem dar.

Zusammenfassend kann zur Linkerproblematik festgestellt werden, dass für die Darstellung von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken unterschiedlich spaltbare Linker zur Verfügung stehen. An der Zellulose ist der basisch spaltbare Ester-Linker, der durch Säuren zu spaltenden Rink-Linker und ein photolabiler Linker einsetzbar. An der PP-Membran sind sowohl zwei unterschiedliche säurelabile Linker (Rink- und Carbamatlinker) sowie der Photolinker für die SPOT-Synthese verwendbar.

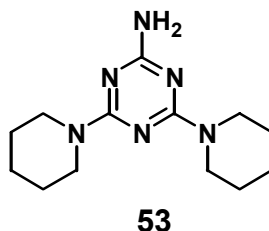
2.3 Immobilisierung von 2,4,6-Trichlor-[1,3,5]-triazin an aminoderivatisierten planaren Oberflächen

Die Darstellung von linearen Oligomeren wie Peptiden,^[34-36, 43, 45, 85, 88, 102] Oligo-*N*-alkylglycinen (Peptoide)^[48, 49] oder Hybride beider Substanzgruppen (Peptomere)^[52] auf Zellulosemembranen durch die SPOT-Synthese wurde bereits beschrieben. Den Reaktionssequenzen dieser Verbindungen ist gemein, dass am Ende eines jeden Cyclis eine Aminofunktion generiert wird (vgl. Kapitel 1.1). Diese jeweilige membrangebundene Aminogruppe soll, neben der Aminogruppe der Linker, zum Aufbau von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken eingesetzt werden, da hierdurch die bereits gut etablierten Synthesen der SPOT-Technik für die Erhöhung der Diversität der Zielbibliotheken genutzt werden können. Die Einführung des Triazinringes soll durch nucleophile Substitution eines Chloratoms von 2,4,6-Trichlor-[1,3,5]-triazin (Cyanurchlorid **5**) mit den *N*-Termini der Oligomere bzw. der Aminogruppe des Linkers an der Zellulose- oder PP-Membran erfolgen (Schema 16).



Schema 16: Immobilisierung von Cyanurchlorid an einer aminoderivatisierten Oberfläche.

Die Effizienz der Immobilisierung von Cyanurchlorid an membrangebundenen Aminogruppen wurde an einer Rink-Linker-modifizierten Zellulose untersucht und anschliessend mit den Ergebnissen an der PP-Membran verglichen. Für die Untersuchungen wurde an einem Tentagel-Rink-Harz die Modellverbindung 4,6-Dipiperidin-1-yl-[1,3,5]-triazin-2-ylamin **53** synthetisiert, um eine quantifizierbare Substanzmenge für Lösungen mit bekannter Konzentration für Eichkurven zu erhalten. Die verbleibenden Chloratome wurden nach Immobilisierung des Cyanurchlorids **5** aus Stabilitätsgründen des Produktes mit Piperidin gequenchet.



Für die Erstellung einer Eichkurve wurden verschiedene Konzentrationen von 0,1-10 mM in wässrigem Acetonitril hergestellt und die Integrale der UV-Absorption bei 220 nm an einer HP-1100 bestimmt (Abb. 8). Durch Kopplung einer Massendetektion an die HPLC konnten die Sensitivitäten des UV- und des Massendetektors verglichen werden (s.u.).

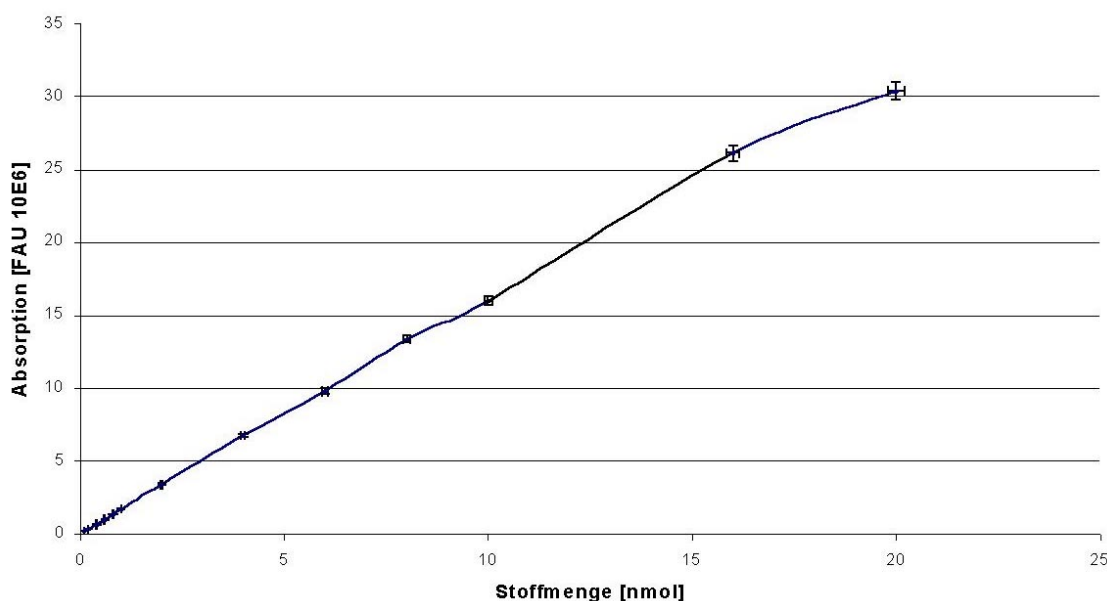


Abb. 8: Integral der UV-Absorption bei 220 nm in Abhängigkeit von der Injektionsmenge an **53**.

Die Untersuchung hat ergeben, dass bei einer Injektionsmenge von mehr als 20 nmol in das HPLC-System eine Sättigung des Signals des UV-Detektors eintritt, dies spiegelt sich im nichtlinearen Teil der Eichkurve (ab ca. 18 nmol) wieder. Eine Injektionsmenge von 0,05 nmol liefert ein noch hinreichend gut zu erkennendes UV-Signal (ca. 85.000 FAU gegenüber 1.631.000 für 1 nmol), wobei selbst 0,01 nmol ein eindeutiges Signal in der Ionenspur der Massenkopplung liefern. Dies ist für die Auffindung und Aufklärung von etwaigen Nebenreaktionen bei so geringen Mengen wie sie durch die SPOT-Synthese anfallen von Bedeutung.

Die Immobilisierung von Cyanurchlorid an aminoderivatisierter Zellulose erfolgte unter verschiedenen Bedingungen (Tabelle 4) mit anschliessender Substitution der verbleibenden Chloratome durch Inkubation der derivatisierten Zellulose in 50 %-iger Piperidin-Lösung

bei 60°C für vier Stunden. Es wurden drei SPOTs ausgestanzt und **53** nach TFA-Abspaltung erhalten. Die Fmoc-Quantifizierung der Rink-Linker-modifizierten Zellulose bildete den „100 %“-Wert. **53** wurde in einem definiertem Volumen gelöst und durch Injektion eines Aliquots in die HPLC-Anlage konnte die Ausbeute direkt aus dem Verhältnis der gemessenen HPLC-Peakfläche und dem erwarteten Wert nach Fmoc-Quantifizierung bestimmt werden. Durch eine HPLC-MS Kopplung konnte sichergestellt werden, dass die richtige HPLC-Peakfläche quantifiziert wurde und dass ferner alle verbliebenen Chloratome durch Piperidin substituiert wurden.

Tabelle 4: Variation von Zeit, Konzentration und Base bei der Immobilisierung von Cyanurchlorid an einer Rink-Linker-modifizierten Zellulosemembran **38a**.

Nr.	Konzentration von 5 [M]	Zeit [min]	Base	Ausbeute [%]
1	1 in DCM	15	-	71
2	1 in DCM	30	-	73
3	1 in DCM	15	10 % DIEA	88 ^a
4	1 in DMF	15	-	38 ^a
5	1 in DMF	15	10 % DIEA	45 ^a
6	2 in DCM	15	-	85
7	2 in DCM	30	-	89
8	2 in DCM	15	10 % DIEA	93 ^a
9	2 in DMF	15	-	36 ^a
10	4 in DCM	15	-	90

^a Gesamtausbeute an immobilisiertem Cyanurchlorid und Nebenprodukten (s. Text)

Alle Immobilisierungsversuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. In Lösung werden bei Raumtemperatur am Cyanurchlorid zwei Chloratome durch Amine substituiert, folglich musste die Möglichkeit einer Verbrückung von zwei Rink-Aminogruppen mit einer Triazineinheit berücksichtigt werden. Es stellte sich heraus, dass bei niedrigen Konzentrationen und speziell bei Zusatz von DIEA eine solche Verbrückung zu 8 bzw. 6 % auftrat (Nr. 3 und 8), was jedoch durch Verwendung hoher Konzentrationen an Cyanurchlorid in DCM ohne Basenzusatz vermieden werden konnte (Nr. 7 und 10). Zusätzlich konnte eine geringe Menge (3-5 %) an hydrolysiertem Triazinresten bei der Verwendung von DIEA nachgewiesen werden (Nr. 3 und 8). DMF erwies sich als ungeeignetes Lösungsmittel, da hier das *N,N*-Dimethyl-6-piperidin-1-yl-[1,3,5]-triazin-2,4-diamin als Nebenprodukt auftritt (Nr. 4, 5 und 9), wobei die höchste Menge mit fast 45 % unter Nr. 5 auftrat. Nach mehrfachem Waschen der Dichlor-[1,3,5]-triazin-modifizierten Membranen (Nr. 1, 2, 3, 6, 7, 8 und 10) mit DMF konnte dieses Nebenprodukt hingegen nicht nachgewiesen werden, was auf eine Zersetzung des DMF durch Cyanurchlorid in Lösung hinweist. Die weiteren Synthesen von membrangebunden Dichlor-[1,3,5]-triazinen an Zellulosemembranen erfolgten ohne Zusatz von Basen, da so sehr gute Ausbeuten (Tabelle 4, Nr. 7) und weniger Nebenprodukte erhalten werden konnten. Ferner kann so das Problem einer Alkylierung der Zellulose durch Cyanurchlorid minimiert werden. Diese

Modifikationen wären bei einem Festphasen-Screening besonders problematisch, da die an der Zelluloseoberfläche entstandenen Nebenprodukte die Proteine binden können. Die Zellulose-Triazinderivate könnten somit „falsch-positive“ Ergebnisse in den Bindungsstudien liefern.

Für die Immobilisierung von Cyanurchlorid an der aminoderivatisierten PP-Membran wurde nicht unter allen Bedingungen untersucht, die bereits an der Zellulose verwendet wurden. DMF als Lösungsmittel wurde zur Kontrolle nur in einem Fall eingesetzt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Variation von Zeit, Konzentration und Base bei der Immobilisierung von Cyanurchlorid **5** an einer Rink-Linker-modifizierten PP-Membran **38b**.

Nr.	Konzentration von 5 [M]	Zeit [min]	Base	Ausbeute [%]
1	1 in DCM	15	-	48
2	1 in DMF	15	-	26 ^a
3	2 in DCM	15	-	68
4	2 in DCM	30	-	76
5	2 in DCM	15	10 % DIEA	92 ^a
6	2 in DCM	30	10 % DIEA	93 ^a

^a Gesamtausbeute inklusive Nebenprodukten (s. Text)

Die Verwendung von DMF als Lösungsmittel lieferte interessanterweise erneut die schlechtesten Ergebnisse (Nr. 2). Die Verwendung von Base war notwendig (Nr. 5 und 6), und im Vergleich zur Zellulosemembran war der Anteil von ca. 2 % an hydrolysiertem Triazin deutlich geringer. Eine Erklärung hierfür könnte die Membranoberfläche darstellen, die im Gegensatz zur Zellulose keine protonierbaren Funktionalitäten besitzt, welche die bei der Immobilisierung entstandene HCl abpuffern können. Eine längere Reaktionszeit als 15 min liefert keine signifikante Erhöhung der Ausbeute (Nr. 6). Bei der Verankerung von Cyanurchlorid an der PP-Membran wurde deswegen stets eine Reaktionszeit von 15 min unter Zusatz von 10 % DIEA verwendet. Bei der Verwendung einer 2 M Lösung von Cyanurchlorid konnte keine Überbrückung zweier Aminogruppen durch einen [1,3,5]-Triazinring gefunden werden.

Eine Immobilisierung des Cyanurchlorids an der PP-Membran sollte jedoch nicht nur am Rink-Linker, sondern auch am Carbamatlinker erfolgen. Für den Carbamatlinker wurden Ethylendiamin und Piperazin als Modellamine gewählt. Die Übertragung der am Rink-Linker erarbeiteten Ergebnisse zur Verankerung zeigte, dass es für die Vollständigkeit der Reaktion mit Cyanurchlorid weniger wichtig war, ob es sich hierbei um eine primäre oder sekundäre Aminogruppe handelt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Variation von Zeit, Konzentration und Base bei der Immobilisierung von Cyanurchlorid am Carbamatlinker **41** auf einer PP-Membran.

Nr.	Amin	Konzentration von 5 [M]	Base	Zeit [min]	Ausbeute [%]
1	Ethylendiamin 41-1	2 in DCM	-	15	66
2	Ethylendiamin 41-1	2 in DCM	-	30	78
3	Ethylendiamin 41-1	2 in DCM	10 % DIEA	15	94 ^a
4	Piperazin 41-6	2 in DCM	-	15	62
5	Piperazin 41-6	2 in DCM	-	30	81
6	Piperazin 41-6	2 in DCM	10 % DIEA	15	96 ^a

^a Gesamtausbeute inklusive Nebenprodukte (s. Text)

Der Zusatz von DIEA bei der Reaktion von Cyanurchlorid an PP-Membranen erwies sich sowohl bei prim. als auch sek. Aminen als notwendig (Nr. 3 und 6). Wie im Fall der Rink-Linker-modifizierten PP-Membran lag auch hier der Anteil an hydrolysiertem Triazinderivat bei ca. 2 %. Eine Quervernetzung zweier Amine durch einen Triazinring wurde nicht beobachtet.

Um die Immobilisierung von Cyanurchlorid an membrangebunden Aminosäuren zu untersuchen, wurde Leucin als Modellaminosäure gewählt. Hierzu wurde zunächst Fmoc-Leu-OPfp mit den Aminofunktion des Rink-Linkers von **38a** umgesetzt und der *N*-Terminus mit Piperidin entschützt. Es wurden verschiedene Reaktionsbedingungen für das Anbringen von Cyanurchlorid untersucht sowie Ausbeute und Reinheit mittels HPLC-MS Technik bestimmt. Die Ergebnisse sind zusammenfassend in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Untersuchungen zur Immobilisierung von Cyanurchlorid **5** an einer Leu-Rink-Linker-derivatisierten Zellulosemembran **38a-1**.

Nr.	Konzentration von 5 [M]	Zeit [min]	Base	Ausbeute [%]
1	1 in DCM	15	-	88
2	2 in DCM	15	-	92
3	2 in DCM	30	-	93
4	2 in DCM	15	10 % DIEA	98 ^a
5	2 in DCM	15	1 % DIEA	98 ^a

^a Gesamtausbeute inklusive Nebenprodukte (s. Text)

Bei diesen Untersuchungen hat sich erneut gezeigt, dass die Immobilisierung von Cyanurchlorid an der aminoderivatisierten Zellulose auch ohne Base nahezu vollständig verlief. Zwar liess sich durch die Verwendung von DIEA die Effizienz geringfügig steigern (Nr. 4 und 5), jedoch waren bei Zusatz von 1 % DIEA (Nr. 5) ca. 4 % hydrolysierte

Triazinderivate nachweisbar. Im Verlauf weiterer Untersuchungen wurde deswegen auf die Zugabe von Base bei der Verankerung von Cyanurchlorid an Zellulosemembranen verzichtet.

Da sich bereits beim Carbatlinker gezeigt hatte, dass sich auch sek. Amine vollständig mit Cyanurchlorid alkylieren lassen, wurden für die Immobilisierung an Peptoiden keine grösseren Schwierigkeiten erwartet. So liessen sich auch die *N*-Termini von Peptoiden an einer Zellulosemembran mit einer 2 M Lösung von Cyanurchlorid in DCM im Verlauf von 30 min ohne Zusatz von Base zu 94 % umsetzen.

Die Möglichkeiten zur Darstellung von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken, die sich nun eröffnen sind enorm. Bei einer Kombination je einer der beiden Monomereinheiten (Aminosäuren und *N*-Alkylglycine) miteinander ergeben sich vier Subtypen. Setzt man zur Synthese dieser Subtypen die 20 proteinogenen Aminosäuren und 40 Amine für die Darstellung der *N*-Alkylglycine ein, so ergeben sich 3600 Kombinationen. Da diese Synthesen entweder am Rink- bzw. Photolinker oder am Carbatlinker (zugänglich aus 10 Diaminen) erfolgen kann, erhält man fast 40000 verschiedene Verbindungen als ersten Diversitätspunkt für die Synthese von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken, wobei lediglich ein Drittel der Möglichkeiten des Cyanurchlorids zur Einführung verschiedener Reste ausgenutzt wurde. Im Folgenden sollten die verbleibenden Chloratome am [1,3,5]-Triazinring schrittweise durch Nucleophile substituiert werden.

2.4 Nucleophile Substitution an membrangebundenen 4,6-Dichlor-[1,3,5]-triazinen

Ziel der folgenden Untersuchungen war es Bedingungen zu finden, unter denen verschiedene Nucleophile selektiv mit nur einem der beiden Chloratome des membrangebundenen Dichlor-[1,3,5]-triazines zur Reaktion gebracht werden können. Diese Chemoselektivität ist eine Voraussetzung für die Darstellung möglichst diverser, unsymmetrischer [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken ausgehend von Cyanurchlorid **5**.

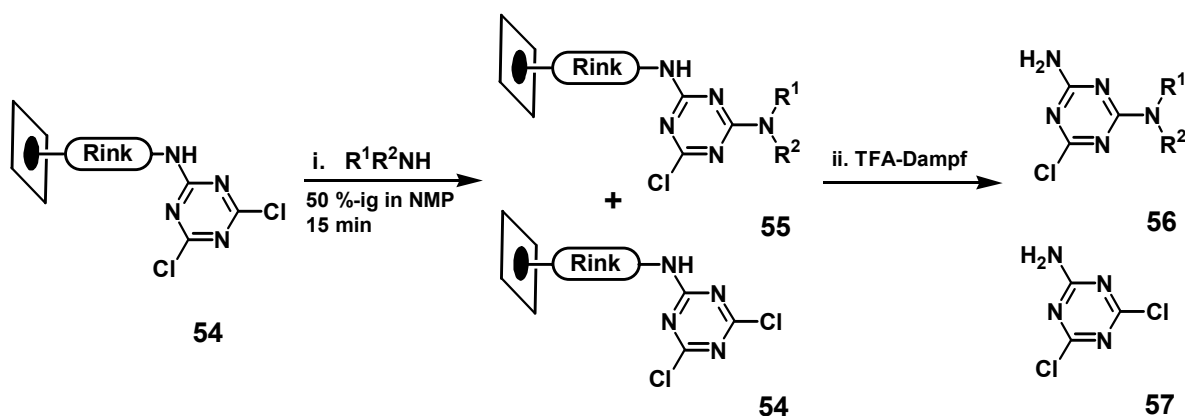
In Lösung wurde die temperaturabhängige Substitution der Halogene des Cyanurchlorids durch verschiedene Nucleophile untersucht.^[2, 3] Es wurden neben einer Reihe von Aminen^[3, 7, 116] auch Alkohole^[75, 76] und Thiole^[117, 118] unter Zusatz von Basen bei erhöhter Temperatur verwendet. Für den Einsatz in der SPOT-Synthese sind Thiole aufgrund ihres meist intensiven Geruches ungeeignet. Die Verwendung von Aminen und Alkoholen ist hingegen prinzipiell möglich. Die spezielle Reaktivität von Dichlor-[1,3,5]-triazinen bei der temperaturabhängigen Substitution der Halogene durch verschiedene Nucleophile, wurde bislang jedoch nur in geschlossenen Systemen (Synthesereaktoren) eingesetzt, wo hohe Temperaturen^[22, 29] oder lange Reaktionszeiten (3-4 Tage)^[23] problemlos zu erreichen sind.

Diese Bedingungen lassen sich in der SPOT-Synthese allerdings nicht realisieren. Im Folgenden sollten Alternativen gefunden werden, die eine effiziente Synthese von unsymmetrisch substituierten [1,3,5]-Triazinen unter SPOT-Bedingungen ermöglichen.

2.4.1 Verwendung von *N*-Nucleophilen unter SPOT-Synthese-Bedingungen

Die kommerzielle Verfügbarkeit strukturell sehr unterschiedlicher Amine (über 3700 prim. und sek. Amine allein von der Sigma-Aldrich Firmengruppe)^[119] machen sie zu einer bevorzugten Diversitätsquelle in der kombinatorischen Chemie für die Findung und Entwicklung von Leitstrukturen.^[19, 120-123] Im Verlauf dieser Arbeit sollten einige repräsentative Vertreter unterschiedlicher Gruppen für die Monochlorsubstitution an membrangebundenen Dichlor-[1,3,5]-triazinen unter SPOT-Synthese-Bedingungen getestet werden. Dies erfolgte in zwei Abschnitten; Vortests mit fünf Testaminen zur Bestimmung geeigneter Reaktionsbedingungen und anschließender Evaluierung vieler Amine unter den gefundenen Bedingungen. Als Modell wurde das über einen Rink-Linker an der Zellulose immobilisierte Dichlor-[1,3,5]-triazin gewählt, an dem zunächst fünf Amine getestet wurden (Schema 17). Für die Voruntersuchungen wurden möglichst unterschiedliche Amine, ohne weitere reaktive Funktionen gewählt; *n*-Butylamin (prim. Alkylamin mit niedrigem Siedepunkt), Cyclohexylamin (prim. Alkylamin am sek. Zentrum, hoher Siedepunkt), Piperidin (sek. Amin, hohe Reaktivität), Benzylamin (Arylamin, hohe Reaktivität) und Anilin (niedrige Reaktivität).

Mit dieser Auswahl an Aminen war es geplant, den Einfluss von Konzentration und Reaktionszeit auf die Effizienz der Chlorsubstitution zu untersuchen. Als Lösungsmittel wurde NMP aufgrund seiner Unflüchtigkeit gewählt. Alle Reaktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Untersuchungen wurden mit 2 µl (das benötigte Volumen, um die Fläche eines SPOTs zu tränken) einer 50 %-igen Lösung des jeweiligen Amins in NMP ohne Zusätze von Basen begonnen. Die Bestimmung der optimalen Reaktionszeit bei jeder Synthese an fester Phase ist allgemein ein Problem, da zur Beurteilung des Reaktionsfortschrittes das Edukt/Produkt-Gemisch erst vom polymeren Träger abgespalten werden muss. Die Wahl der Reaktionszeit unter SPOT-Synthese-Bedingungen ist prinzipiell eingeschränkt; es können keine längeren Zeiten, als maximal 45 min gewählt werden, da dann das Lösungsmittel verdampft ist. In dem Fall, dass die Reaktion bis zu dieser Zeit noch nicht vollständig erfolgte, müssen die Reagenzien erneut verteilt (gespottet) werden. Als anfängliche Reaktionszeit wurde 15 min gewählt, eine Zeit in der das NMP nicht komplett verdampft und die SPOTs noch immer feucht wirken. Die Reaktion wurde durch rasches Entfernen der Überschüsse durch Waschen der Membran mit DMF, MeOH und DCM beendet und die Reaktionsprodukte mit TFA von der Zellulose abgespalten (Schema 17).



Schema 17: Umsetzung membrangebundener Dichlor-[1,3,5]-triazine 54 mit unterschiedlichen Aminen und anschließende Abspaltung für eine Analytik.

Nach Abspaltung der Produkte vom Rink-Linker mit TFA und Analytik der ersten Untersuchungsreihe mittels HPLC-MS zeigte sich, dass Piperidin zwar hoch reaktiv ist, jedoch aufgrund seines hohen Dampfdrucks auch mit den Chloratomen von benachbarten [1,3,5]-Triazin-SPOTs reagiert. Ferner vermag Piperidin selbst bei Raumtemperatur innerhalb von kurzer Zeit ca. 5 % beide Chloratome der membrangebundenen Dichlor-[1,3,5]-triazine **54** zu substituieren. Es ist somit für die SPOT-Synthese nur bedingt einsetzbar. Bei den anderen untersuchten Aminen wurde diese Nebenreaktion nicht beobachtet (Tabelle 8).

Tabelle 8: Erste Untersuchung zur Monochlorsubstitution an **54** mit unterschiedlichen Aminen. Bestimmt wurde das Produkt zu Edukt Verhältnis aus der Peakfläche der HPLC-Spur bei 220 nm nach Abspaltung.

Nr.	Amin	Verhältnis 56 : 57
1	<i>n</i> -Butylamin	2 : 1
2	Cyclohexylamin	1 : 1
3	Piperidin	9 : 1 ^a
4	Benzylamin	4 : 1
5	Anilin	1 : 1

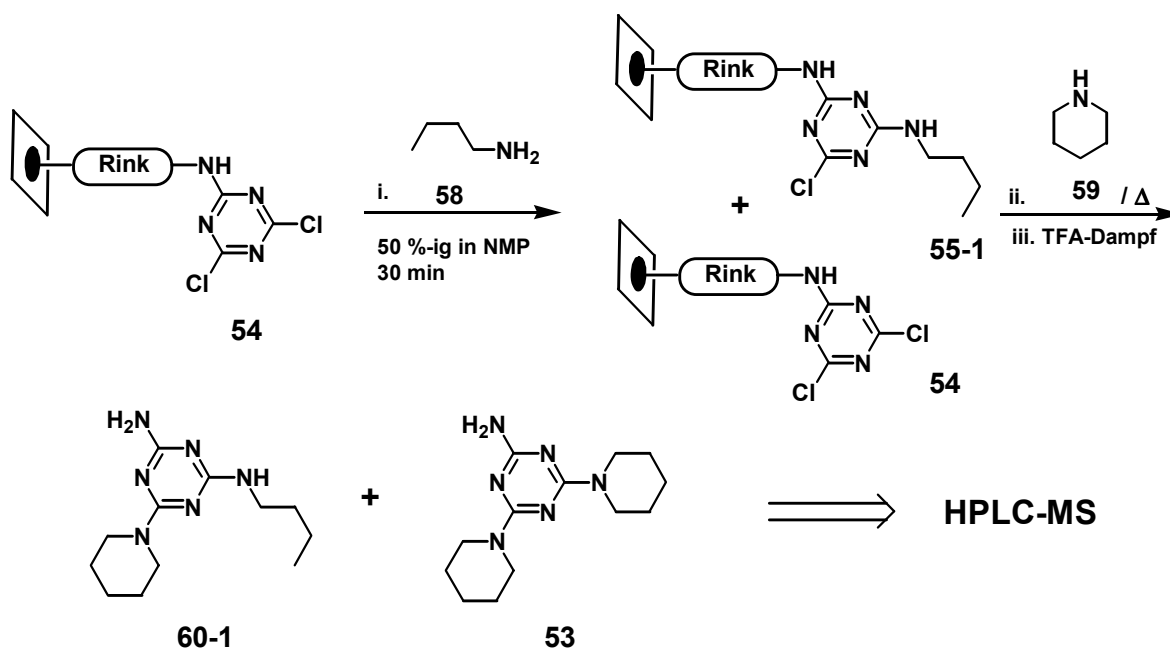
^a plus Substitution des letzten Chloratoms

Für weitere Tests bei Raumtemperatur wurde auf die Verwendung von Piperidin verzichtet, um weitere Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Die Reaktionszeit wurde nach dem Spotten der Aminen auf 30 min erhöht, bevor die Überschüsse durch Waschen der Zellulose mit DMF, MeOH und DCM entfernt wurden. Diesmal waren die Reaktionen in allen vier Fällen nahezu vollständig, lediglich beim Anilin konnte verbliebenes Dichlor-[1,3,5]-triazin **57** nach der Abspaltung von ca. 5 % detektiert werden. Aufgrund dieser positiven Ergebnisse war eine weitere Optimierung der Reaktionsbedingungen nicht notwendig. Ein Zusatz von Base wie bei der Synthese am Harz^[29] oder in Lösung^[22] beschrieben wurde, scheint an Zellulose, zumindest bei der verwendeten Testauswahl an Aminen, nicht notwendig. Dies lässt sich durch den grösseren Überschuss an Amin bezogen auf die Dichlor-[1,3,5]-triazine an der Zellulose erklären. An einer Zellulosemembran mit einer Beladung von ca. 100 nmol/SPOT (400 nmol/cm²) entsprechen 2 µl einer 50 %-igen Lösung von z.B. *n*-Butylamin (≈ 5 M) einem 100-fachem Überschuss, verglichen mit üblichen 5 bis 20-fachen Überschüssen bei Synthesen am Harz.

Der nächste Schritt bestand aus der Evaluierung der Aminen als Bausteine für die Darstellung von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken mittels SPOT-Synthese. Hierfür erfolgte eine Einteilung der Aminen in Gruppen, aus denen dann einige Derivate unter den zuvor bestimmten Bedingungen (ca. 5 M Lösung in NMP, Raumtemperatur, 30 min Reaktionszeit, keine Basenzusätze) getestet wurden. Die Einteilung der grossen Anzahl an den strukturell diversen Aminen ist ein kompliziertes Unterfangen. Allgemein sollten nur wenige Parameter zur Charakterisierung gewählt werden, um eine „überschaubare“ Anzahl von Gruppen zu erhalten. Die Einteilung der Aminen erfolgte in die vier folgenden Gruppen;

- (A) Alkylamine
- (B) mehrfach funktionalisierte Alkylamine
- (C) Arylamine
- (D) Anilinderivate

Ein generelles Problem bei der Synthese von Monochlor-[1,3,5]-triazinen stellt die Reaktivität des verbleibenden Chloratoms dar. Speziell bei nicht vollständiger Reaktion eines Chloratoms bei Raumtemperatur zu **55** kann es unter Umständen bis zur endgültigen Analytik zur Hydrolyse aller verbliebener Chloratome kommen. Da mittels HPLC die Umsetzungen durch UV-Absorption der Produkte bestimmt wurden, verfälscht die nachträgliche Hydrolyse der Produkte die Reinheit der ursprünglichen Reaktionsprodukte. Sollte hingegen das verwendete Amin ähnlich reaktiv sein wie das Piperidin, so können zum Teil bei Raumtemperatur beide Chloratome von **54** substituiert werden. Im Fall von Aminen mit aromatischen Resten kann es aufgrund der UV-Absorption des Arylrestes zu falsch negativen Interpretationen der HPLC-Spuren kommen, da das Nebenprodukt mit zwei aromatischen Resten einen höheren Absorptionskoeffizienten besitzt, als die Monochlor-aryl-amino-[1,3,5]-triazinverbindung. Umgekehrt kommt es zu falsch-positiven Werten, wenn die Umsetzung unvollständig war, da man das Verhältnis von Dichlor-[1,3,5]-triazin zu Monochloraryl-amino-[1,3,5]-triazinverbindung aus den Integralen der HPLC-Peaks bildet. Aus diesen Gründen wurden für alle weiteren Untersuchungen die verbleibenden Chloratome mit Piperidin, im Fall von untersuchten Alkylaminen (Gruppe A und B) und Benzylamin im Fall von untersuchten Arylaminen und Anilinderivaten (Gruppe C und D) zur Reaktion gebracht. Dies gelang durch Inkubation der Membran bei 80°C (vier Stunden) mit einer 5 M Lösung des entsprechenden Amins in NMP. Die Bestimmung des Umsatzes des Testamines z.B. *n*-Butylamin **58** mit Rink-Linker gebundenem Dichlor-[1,3,5]-triazin erfolgte aus dem Verhältnis von Monopiperidintriazin **60** zu Dipiperidintriazin **53** (Schema 18). Durch diese Methode können Reinheiten und Umsätze auch zwischen den Gruppen A-D verglichen werden, da diese jeweils auf einen internen Standard normiert sind.

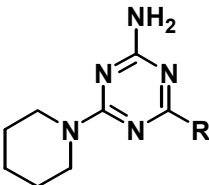
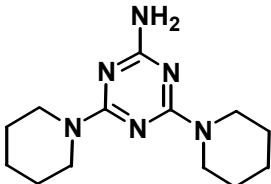
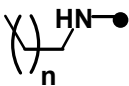
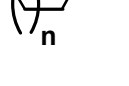
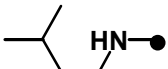
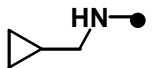
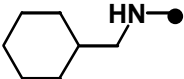
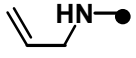
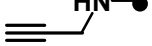
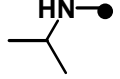
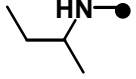
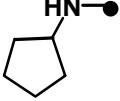


Schema 18: Bestimmung der Umsetzung von Aminen mit Dichlor-[1,3,5]-triazin **54** am Beispiel des *n*-Butylamins **58**.

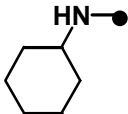
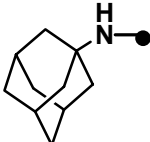
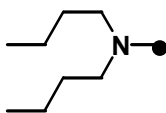
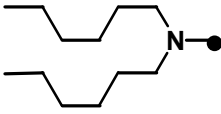
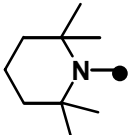
(A) Alkylamine

Im Folgenden wurden weitere wohlfeile Amine auf ihre Verwendbarkeit zur Darstellung von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken untersucht. Die erste Gruppe bestand aus verschiedenen prim. Alkylaminen, die keine weiteren funktionellen Gruppen tragen. Bestimmt wurden die Reaktionsumsätze aus dem Verhältnis **60** : **53** und die erzielten Reinheiten unter den Bedingungen der SPOT-Synthese an kontinuierlichen Oberflächen (Tabelle 9). In einigen Fällen physikochemisch sehr ähnlicher Amine (z.B. Cyclohexylamin und Cyclopentylamin) die Tests nur an Zellulose- oder PP-Membranen durchgeführt wurden, falls ein Derivat (hier Cyclohexylamin) keinen signifikanten Unterschied zwischen den polymeren Trägern zeigte.

Tabelle 9: Umsatz und Reinheit nach Monochlorsubstitution an **54** durch Alkylamine unter SPOT-Synthese-Bedingungen.

<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>60</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>53</p> </div> </div>					
Nr.	Amin	Konzentration	Umsatz ^a / Reinheit ^b [%] an der		
	R●	[M] in NMP	Zellulose	PP-Membran	
60-1	n = 2	5	96 / 94	n.u. ^c	
60-2	 n = 1	5	> 99 / 94	> 99 / 95	
60-3	 n = 3	5	92 / 87	n.u. ^c	
60-4	n = 6	5	> 99 / 87	n.u. ^c	
60-5	 5	5	> 99 / 93	n.u. ^c	
60-6	 5	5	89 / 84	95 / 90	
60-7	 5	5	93 / 80	95 / 90	
60-8	 5	5	95 / 86	95 / 93	
60-9	 5	5	> 99 / 96	> 99 / 96	
60-10	 5	5	65 / 60	n.u. ^c	
60-11	 5	5	> 99 / 92	n.u. ^c	
60-12	 5	5	n.u. ^c	92 / 90	

Fortsetzung Tabelle 9

Nr.	Amin	Konzentration [M] in NMP	Umsatz ^a / Reinheit ^b [%] an der	
	R-●		Zellulose	PP-Membran
60-13		5	98 / 91	98 / 91
60-14		1	15 / 10	15 / 10
60-15		4,5	99 / 97	96 / 95
60-16		4,5	98 / 96	n.u. ^c
60-17		4	< 1 / < 1	< 1 / < 1

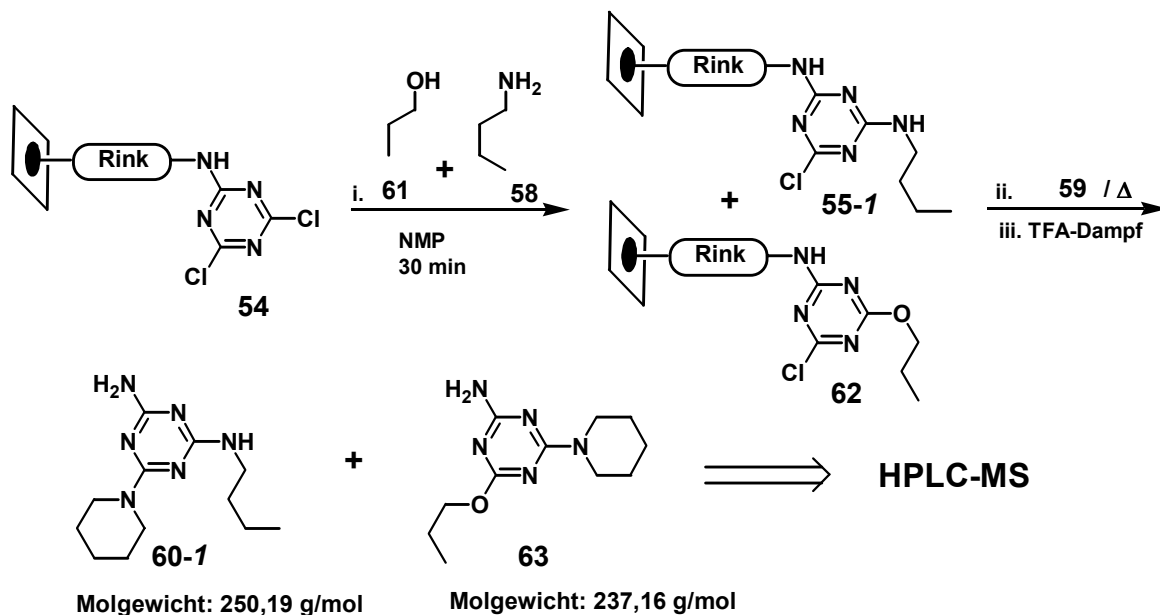
^a aus dem Verhältnis **60** : **53**^b nach HPLC bei 220 nm^c n.u. nicht untersucht

In α -Position unverzweigte Amine (**60-1** bis **60-9**) lieferten gute Umsetzungen an beiden Oberflächen. Sogar Propylamin **60-2** ergab, trotz des niedrigen Siedepunktes und damit schnelleren Verdampfens, einen sehr guten Umsatz zum gewünschten Produkt mit hoher Reinheit. Das ebenfalls leicht flüchtige Isopropylamin **60-10** lieferte allerdings nur mittelmässige Umsetzung im Gegensatz zu den restlichen Aminen am sek. Zentrum (**60-11** bis **60-13**). Sterisch gehinderte Amine wie Dihexylamin und 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin (**60-16** bzw. **60-17**) zeigten schlechtere bzw. nahezu keine Umsetzungen und geringe Reinheiten. Für den Fall, dass die angestrebte Konzentration von 5 M in NMP nicht erreicht werden konnte, wie beim 1-Aminoadamantan (**60-14**), verliefen die Substitutionen nur mit geringen Umsätzen. Bei keinem der untersuchten Amine zeigte sich ein signifikanter Unterschied bzgl. Umsätze an der Zellulose- und der PP-Membran.

(B) mehrfach funktionalisierte Alkylamine

Die nächste Gruppe an untersuchten Aminen, war die der mindestens bifunktionellen Alkylamine wie Ethylendiamin oder 2-Amino-1,3-propandiol. Bei dieser Gruppe stellte sich die Frage, ob weitere im Molekül vorhandene reaktive Gruppen vor der Umsetzung mit den membrangebundenen Dichlor-[1,3,5]-triazinen geschützt werden müssen. Für den raschen, unkomplizierten Einsatz vieler verschiedener Bausteine kann dies ein Problem sein, falls vor Beginn einer kombinatorischen Synthese mit 40 Bausteinen erst die geeigneten geschützten Derivate dargestellt werden müssen. Die Reaktivität von aliphatischen Alkoholen in Gegenwart von Aminen wurde an einem einfachen Modell sowohl an der Zellulose- als auch an der PP-Membran getestet. Hierzu wurde über den

membrangebundenes Dichlor-[1,3,5]-triazin **54** mit verschiedenen Mischungen von *n*-Butylamin und *n*-Propanol umgesetzt und anschliessend das Verhältnis von *N*- und *O*-substituiertem [1,3,5]-Triazin **60-1** und **63** bestimmt. (Schema 19).



Schema 19: Umsetzung von membrangebundenem Dichlor-[1,3,5]-triazin **54** mit Mischungen (1:5 bis 5:1) aus *n*-Propanol **61** und *n*-Butylamin **58**.

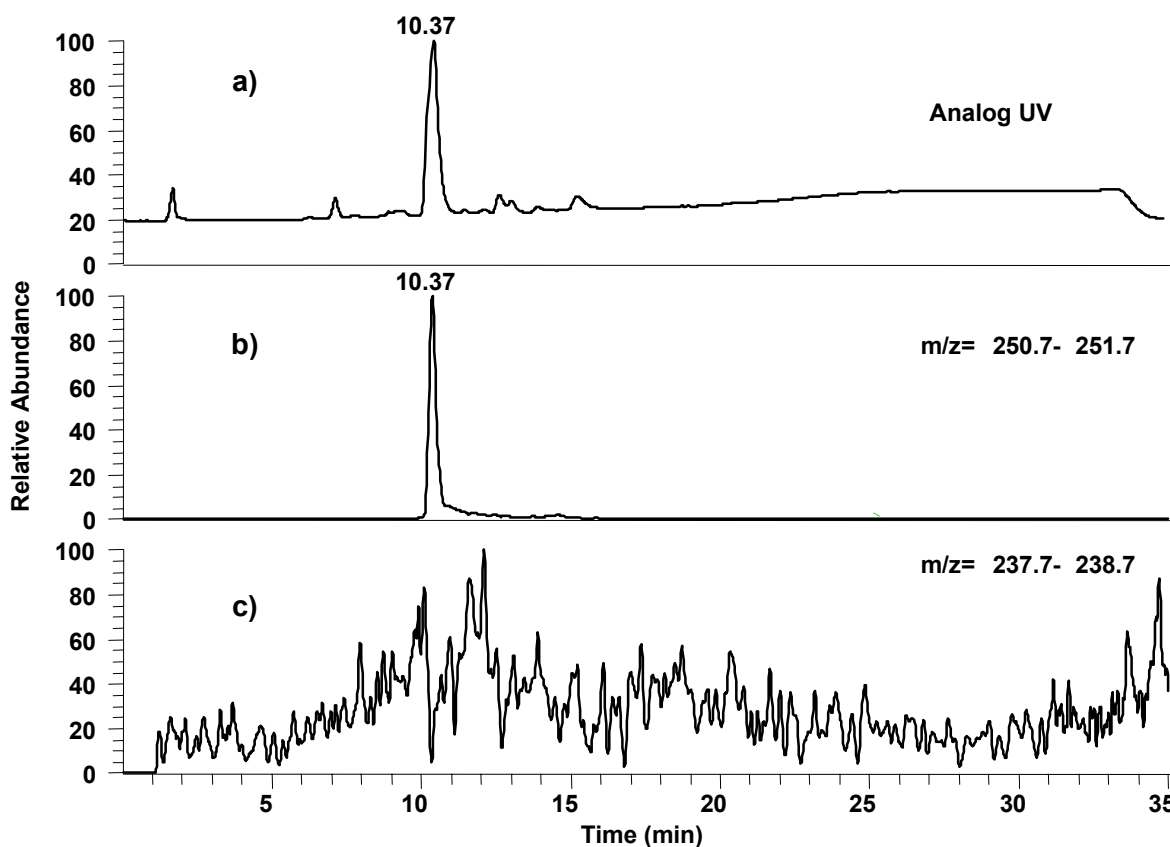
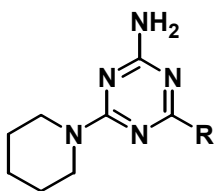


Abb. 9: HPLC-MS-Spuren des abgespaltenen Rohprodukts **60-1** : **63** bei einem Mischungsverhältnis von 1 : 5 (*n*-Butylamin : *n*-Propanol). Abgebildet ist die UV-Spur (a), der Massenfiter für **60-1** ($M+H^+$) (b) und **63** ($M+H^+$) (c).

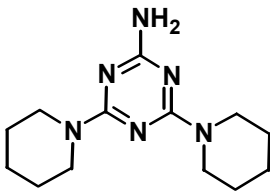
Nachdem die verbliebenen Chloratome mit Piperidin gequenchet wurden, erfolgte die Abspaltung vom polymeren Träger mit TFA-Dampf. Die adhäsiv am Träger gebundenen Substanzen wurden mit wässrigem Acetonitril abgelöst und analysiert (Abb. 9). Die Analytik der erhaltenden Lösungen mittels HPLC-MS zeigte klar, dass selbst bei einem Verhältnis von 1 : 5 (*n*-Butylamin : *n*-Propanol) eine selektive Reaktion des Amins erfolgte. (Abb. 9). Somit scheinen Alkohole in Gegenwart von Aminen unter diesen Bedingungen nicht mit **54** zu reagieren. Die Hydroxylgruppen brauchen also während der Reaktion von Aminoalkoholen mit **54** zu Monochlor-[1,3,5]-triazinen nicht geschützt werden.

Im Anschluss wurde eine Reihe von Aminoalkoholen zur Monochlorsubstitution an **30** an der Zellulose- und der PP-Membran untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

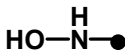
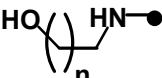
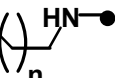
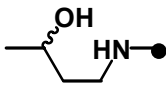
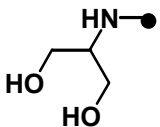
Tabelle 10: Umsatz und Reinheit nach Monochlorsubstitution an **54** durch Aminoalkohole unter SPOT-Synthese-Bedingungen.



60



53

Nr.	Amin R ●	Konzentration [M] in NMP	Umsatz ^a / Reinheit ^b [%] an der	
			Zellulose	PP-Membran
60-18		5 (H ₂ O)	96 / 85	96 / 89
60-19	n = 1	5	> 99 / 96	n.u. ^c
60-20	n = 2	5	> 99 / 95	> 99 / 96
60-21	 n = 3	5	98 / 90	95 / 90
60-22	 n = 4	5	97 / 92	95 / 89
60-23	n = 5	5	96 / 92	95 / 93
60-24		5	98 / 90	n.u. ^c
60-25		5	> 99 / 98	n.u. ^c

^a aus dem Verhältnis **60** : **53**

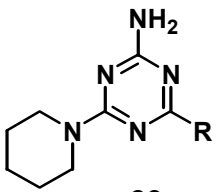
^b nach HPLC bei 220 nm

^c n.u. nicht untersucht

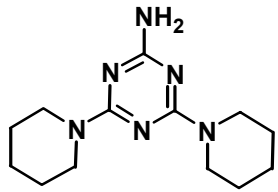
Alle eingesetzten Aminoalkohole lieferten in der SPOT-Synthese sehr gute Ergebnisse. Sowohl an der Zellulose- als auch an der PP-Membran verliefen die Monochlorsubstitutionen nahezu quantitativ. Bei der wässrigen Hydroxylamin-Lösung (**60-18**) kam es allerdings zu einer teilweisen Hydrolyse (ca. 5 %) des Triazinderivates **54**. Das aufgetretene Hydrolyseprodukt begründet die geringere Reinheit. Bei den Aminoalkoholen mit „zusätzlicher“ Alkylkette wurde keine Hydrolyse von **54** beobachtet.

Bei dem Einsatz von Diaminen ist zu erwarten, dass jede im Molekül befindliche prim. oder sek. Aminogruppe mit den membrangebundenen Dichlor-[1,3,5]-triazin reagiert. Zur Schützung zusätzlicher Aminogruppen ist die Boc-Gruppe gut geeignet. Der Vorteil dieser Schutzgruppe besteht darin, dass nach der Abspaltung vom Amin nur flüchtige Komponenten (im Gegensatz zu z.B. Trityl) übrig bleiben, was eine „Aufreinigung“ durch evakuieren ermöglicht. Die Entschützung nach der Synthese kann parallel zur Abspaltung der Substanz vom Rink-Linker durch TFA-Dampf erfolgen. Bei der Verwendung von symmetrischen Diaminen wurde dennoch auf eine Mono-Boc-Schützung verzichtet. Es sollte untersucht werden, ob es trotz des grossen Überschusses an Diamin zu einer Verbrückung zweier Triazineinheiten durch Substitution von zwei Chloratomen unterschiedlicher Triazine mit den beiden „Enden“ des gleichen Diamines kommt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

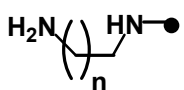
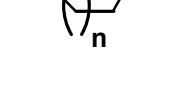

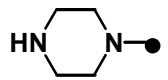
Tabelle 11: Umsatz und Reinheit nach Monochlorsubstitution an **54** durch Alkyldiamine unter SPOT-Synthese-Bedingungen.



60



53

Nr.	Amin R-●	Konzentration [M] in NMP	Umsatz ^a / Reinheit ^b [%] an der Zellulose PP-Membran
60-26a	n = 1	5	> 99 / 91 95 / 91
60-27	n = 2	5	> 99 / 97 97 / 97
60-28	 n = 3	5	93 / 92 n.u. ^c
60-29	 n = 4	5	91 / 88 95 / 92
60-30	n = 5	5	91 / 87 n.u. ^c
60-26b	 5	5	> 99 / 98 ^d 97 / 97 ^d
60-31	 2	2	94 / 91 95 / 91

^a aus dem Verhältnis **60** : **53** ^b nach HPLC bei 220 nm ^c n.u. nicht untersucht

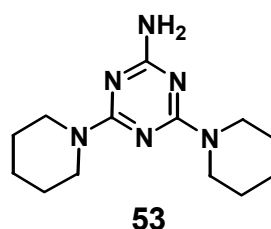
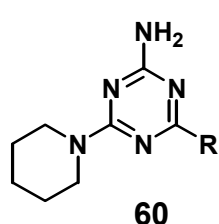
^d Boc-Entschützung bei Abspaltung vom planaren Träger

Die Verwendung von Diamine ohne Mono-Boc-Schützung hat zu keiner Verbrückung zweier Triazineinheiten geführt. Es ist somit problemlos möglich, symmetrische Diamine ungeschützt für die Monochlorsubstitution an Zellulose und PP-Membranen einzusetzen. Ein Vergleich zwischen „freiem“ und Mono-Boc-geschütztem Ethylendiamin (**60-26a** und **b**) hat keinen Unterschied im Rahmen der Messgenauigkeit (ca. ± 2 %) in Umsatz und Reinheit ergeben. Interessanterweise kam es bei den Synthesen unter Verwendung der sowohl ungeschützten als auch Mono-Boc-geschützten prim. Diamine (**60-26** bis **60-30**) im Verlauf der TFA-Abspaltung zu einer Trifluoracetylierung der freien Aminoseitengruppe. Diese Art der Nebenreaktion wurde bereits bei der Peptidsynthese beobachtet.^[124] Die

Trifluoracetyl-Schutzgruppe ist jedoch gegenüber wässrigen Säuren nicht stabil, so kann sie durch ein Wasser-Acetonitril-Gemisch bei einem pH < 6 innerhalb von zwei Stunden entfernt werden. Die Entschützung wurde durch wiederholte HPLC-MS-Analyse der wässrigen Lösung kontrolliert.

Im Folgenden wurden weitere mehrfach funktionalisierte Alkylamine für die Monochlorsubstitution untersucht. Die durchgeführten Reaktionen sollten zeigen, ob Funktionalitäten ohne nucleophile Eigenschaften zu signifikanten Nebenreaktionen bei der Chlorsubstitution führen können. Die Resultate bezüglich Umsätze und Reinheiten an den planaren Oberflächen sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Umsatz und Reinheit nach Monochlorsubstitution an **54** durch mehrfach funktionalisierte Alkylamine unter SPOT-Synthese-Bedingungen.



Nr.	Amin	Konzentration [M] in NMP	Umsatz ^a / Reinheit ^b [%] an der	
	R-●		Zellulose	PP-Membran
60-32		5	95 / 90	96 / 95
60-33		5	> 99 / 96	n.u. ^c
60-34		5	91 / 84	95 / 91
60-35		5	73 / 65	n.u. ^c
60-36		5	85 / 79	95 / 95
60-37		5	85 / 78	n.u. ^c
60-38		5	92 / 83	n.u. ^c
60-39		5	> 99 / 92	n.u. ^c
60-40		5	86 / 65	90 / 84
60-41		5	78 / 62	n.u. ^c

Fortsetzung Tabelle 12

Nr.	Amin	Konzentration [M] in NMP	Umsatz ^a / Reinheit ^b [%] an der	
	R-●		Zellulose	PP-Membran
60-42		3	99 / 93	92 / 90
60-43		2	90 / 48	n.u. ^c
60-44		5	96 / 91	n.u. ^c
60-45		3,5 (H ₂ O)	91 / 85	95 / 82
60-46		3 (H ₂ O)	94 / 90	90 / 82
60-47		3,5 (H ₂ O) ^d	95 / 86	n.u. ^c
60-48		2 (H ₂ O) ^d	95 / 87	n.u. ^c
60-49		2,5 (H ₂ O) ^d	84 / 60	n.u. ^c

^a aus dem Verhältnis **60** : **53** ^b nach HPLC bei 220 nm ^c n.u. nicht untersucht

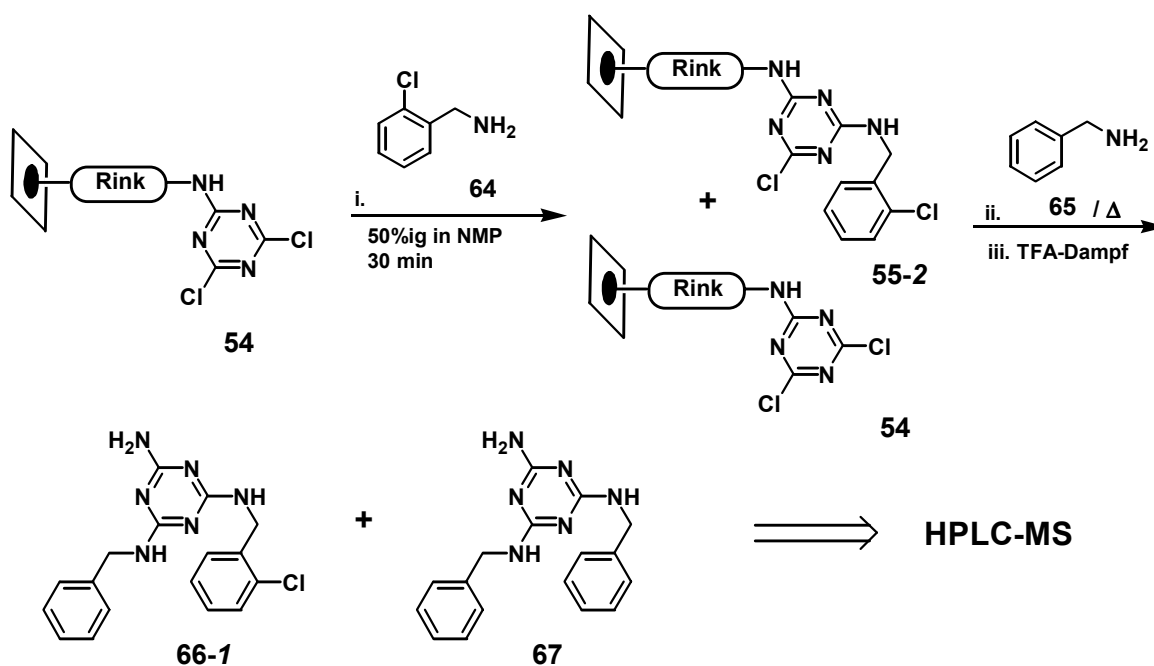
^d freie Säure nach der TFA-Behandlung

Die Synthesen unter Einsatz von Aminen mit zusätzlichen Etherfunktionen (**60-32** bis **60-34**) verliefen problemlos und lieferten die gewünschten Produkte in guten Umsätzen und Reinheiten. Amine mit einer weiteren basischen tert. Aminogruppe hingegen führten in einigen Fällen (**60-35** und **60-39**) zum Auftreten von nicht näher zu charakterisierenden Nebenprodukten. Dieses Auftreten von Nebenprodukten wurde nicht bei dem Homologen 4-(3-Aminopropyl)-morpholin (**60-36**) beobachtet. Das Hydrazinderivat konnte nur mit mässigen Umsätzen und geringer Reinheit für die Monochlorsubstitution zu **60-41** eingesetzt werden. Ein zu 15 % auftretendes Nebenprodukt mit einer um 16 geringen Masse, deutet auf eine Deaminierung der Hydrazingruppe hin. Die Umsetzung von **54** mit 2-Aminoacetaldehyd-diethylacetal verlief nahezu vollständig. Im Zuge der Abspaltung von der planaren Oberfläche mit TFA kam es wie erwartet zur Entschützung der Aldehydfunktion (**60-42**). Die Synthese mit Aminoethylhydrogensulfat lieferte zwar einen guten Umsatz, **60-43** wies aber aufgrund vieler Nebenprodukte nur eine geringere Reinheit auf. Die auftretenden Nebenprodukte entsprachen jedoch nicht einer Hydrolyse des Di- bzw. Monochlor-[1,3,5]-triazinrestes oder eine Abspaltung des Sulfatrestes. In den Fällen mit

vorhandenen Estergruppen im Amin kam es im Verlauf der Synthese, vermutlich bei der Abspaltung vom polymeren Träger mit TFA zur teilweisen Esterhydrolyse, was die etwas geringeren Reinheiten (speziell **60-47**) bei diesen Bausteinen (**60-47** bis **60-49**) erklärt. Die Löslichkeit einiger Aminosäurederivate (**60-45** bis **60-49**) war in NMP so gering (unter 0,5 M), dass Wasser als Lösungsmittel eingesetzt wurde, welches ebenfalls sehr gut für die Synthese unter SPOT-Bedingungen geeignet ist. Zur besseren Benetzung der Oberfläche, speziell der PP-Membran, wurden 0,1 % Tween® 20 zugegeben. Zusammenfassend zeigten sich (im Sinne von möglichen Nebenreaktionen) viele verschiedene funktionelle Gruppen kompatibel mit der Monochlorsubstitution mittels SPOT-Synthese an Zellulose- und PP-Membranen.

(C) Arylamine

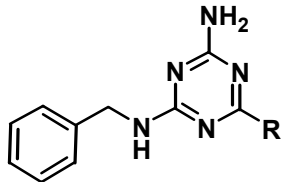
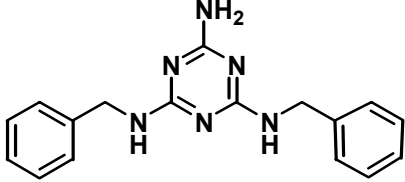
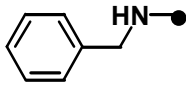
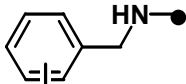
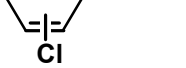

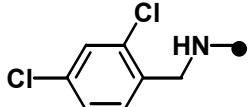
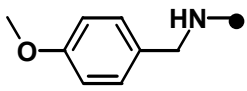
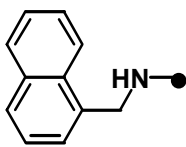
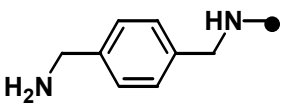
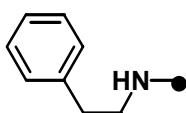
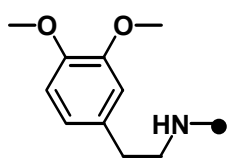
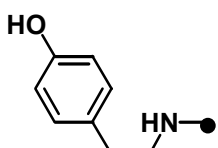
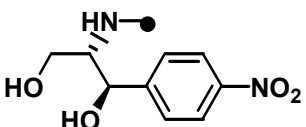
Die dritte Gruppe der untersuchten Amine war die der Arylamine, wobei hierzu nicht nur die Benzylaminderivate zählten, sondern auch solche Amine, die generell im Molekül einen (Hetero-)Aromaten tragen. Lediglich die Anilinderivate wurden aufgrund ihrer allgemeinen geringeren Reaktivität gesondert untersucht. Die Untersuchungen wurden analog zu dem beiden Gruppen A und B durchgeführt, nur das nach Einsatz des Testamines verbliebene Chloratome durch Benzylamin substituiert wurden (Schema 20).



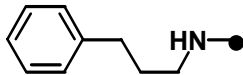
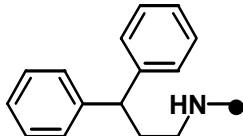
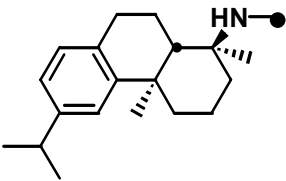
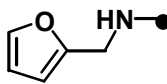
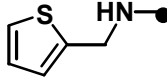
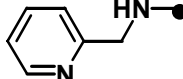
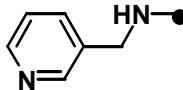
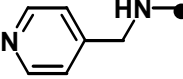
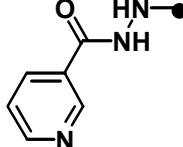
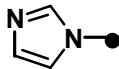
Schema 20: Bestimmung der Umsetzung von Arylaminen mit Dichlor-[1,3,5]-triazin **54** am Beispiel des 2-Chlorbenzylamins **64** nach Abspaltung von der planaren Oberfläche.

Die Untersuchungen wurden vergleichend sowohl an der Zellulose- als auch an der PP-Membran durchgeführt. Die Ergebnisse der zur Monochlorsubstitution an membran-gebundenem Dichlor-[1,3,5]-triazin **54** eingesetzten 21 Arylamine sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Umsatz und Reinheit nach Monochlorsubstitution an **54** durch Arylamine unter SPOT-Synthese-Bedingungen.

				
66		67		
Nr.	Amin R-●	Konzentration [M] in NMP	Umsatz ^a / Reinheit ^b [%] an der	
			Zellulose	PP-Membran
67		5	> 99 / 90 ^d	95 / 95 ^d
66-1	 <i>ortho</i>	5	85 / 75	n.u. ^c
66-2	 <i>meta</i>	5	90 / 87	90 / 86
66-3	 <i>para</i>	5	90 / 77	95 / 88
66-4		5	84 / 79	95 / 82
66-5		5	> 99 / 98	n.u. ^c
66-6		4	94 / 78	n.u. ^c
66-7		5	89 / 73	94 / 81
66-8		5	> 99 / 91	n.u. ^c
66-9		5	98 / 89	96 / 89
66-10		2	97 / 92	n.u. ^c
66-11		2	80 / 60	94 / 70

Fortsetzung Tabelle 13

Nr.	Amin	Konzentration [M] in NMP	Umsatz ^a / Reinheit ^b [%] an der	
	R-●		Zellulose	PP-Membran
66-12		5	> 99 / 94	99 / 91
66-13		5	> 99 / 94	n.u. ^c
66-14		4	85 / 79	92 / 84
66-15		5	84 / 50	95 / 91
66-16		5	96 / 88	94 / 91
66-17		5	91 / 89	95 / 91
66-18		5	> 99 / 93	> 99 / 93
66-19		5	> 99 / 94	n.u. ^c
66-20		2	93 / 78	76 / 53
66-21		2	89 / 83	94 / 85

^a aus dem Verhältnis **66** : **67** ^b nach HPLC bei 220 nm ^c n.u. nicht untersucht^d verbliebene Chloratome mit 3-Chlorbenzylamin substituiert

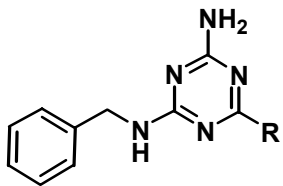
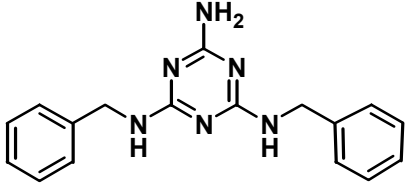
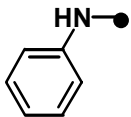
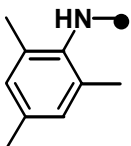
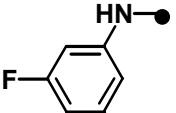
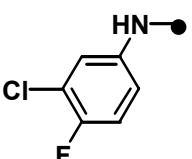
Die Reaktionen verliefen im Durchschnitt mit fast 90 % Umsatz an der Zellulose und mit sogar über 90 % an der PP-Membran. Erwartungsgemäss traten bei einfachen Arylaminen (**67**, **66-6**, und **6-12** bis **66-14**) und solchen mit Chlor- (**66-1** bis **66-4**) oder Methoxysubstituenten (**66-5** und **66-9**) keine Nebenreaktionen auf. Das Diamin (**66-7**) wurde, wie in der vorherigen Gruppe, ohne Schützung der zweiten Aminofunktion eingesetzt. Auch hier wurde keine Verbrückung zweier Triazineinheiten durch ein Diamin beobachtet. In diesen Fällen wurde keine Trifluoracetylierung nachgewiesen. Bei (1S,2S) 2-Amino-1-(4-nitrophenyl)-1,3-propandiol und Furfurylamin (**66-11** und **66-15**) kam es

vermutlich im Verlauf der Synthese an der Zellulosemembran zu multiplen Nebenreaktionen, da hier die Syntheseprodukte durch viele, nicht näher charakterisierbare, Substanzen verunreinigt waren. Die Zielverbindungen in den entsprechenden Fällen von der PP-Membran wiesen eine deutlich höhere Reinheit auf. Im Gegensatz hierzu wurde im Fall des Nicotinhydrazins (**66-20**) eine deutlich geringere Reinheit an der PP-Membran festgestellt. An beiden Membranen kam es jedoch zu nicht eindeutigen Zersetzungen vor oder nach der Abspaltung der Syntheseprodukte. Die Synthese mit den restlichen Heteroarylaminen (**66-16** bis **66-19** und **66-21**) verlief mit guten Umsätzen ohne Auftreten von signifikanten Nebenreaktionen. Insgesamt sind die Arylamine sowohl aufgrund ihrer geringen Flüchtigkeit und hohen Reaktivität gut für den Einsatz zur Darstellung von [1,3,5]-Triazinen unter SPOT-Synthese-Bedingungen geeignet.

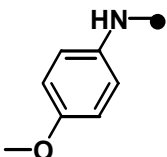
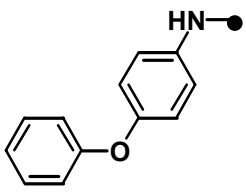
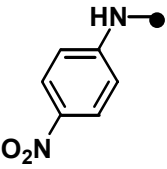
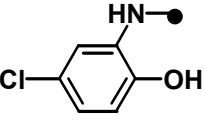
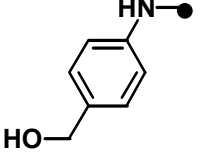
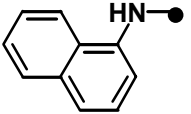
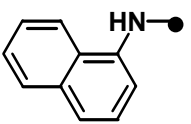
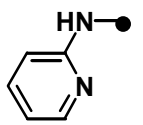
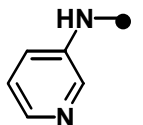
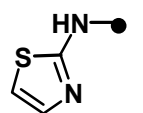
(D) Anilinderivate

Die letzte Gruppe an untersuchten Aminen bestand aus Anilinderivaten und aminosubstituierten Heteroaromaten. Ein Grossteil dieser Verbindungen liegt als Feststoff vor, der sich nur schlecht in NMP oder alternativ in DMSO, Wasser oder DMF löst, so dass nur in zwei von 14 Fällen eine 5 M Lösung erhalten werden konnte. Daher wurden meist nur deutlich geringere Konzentrationen eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Umsatz und Reinheit nach Monochlorsubstitution an **54** durch Anilinderivate unter SPOT-Synthese-Bedingungen.

<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>66</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>67</p> </div> </div>				
Nr.	Amin R ●	Konzentration [M] in NMP	Umsatz ^a / Reinheit ^b [%] an der	
			Zellulose	PP-Membran
66-22		5	99 / 98	99 / 98
66-23		2	15 / 12 ^d	15 / 13 ^d
66-24		5	95 / 86	96 / 91
66-25		3,5	96 / 92	97 / 95

Fortsetzung Tabelle 14

Nr.	Amin	Konzentration [M] in NMP	Umsatz ^a / Reinheit ^b [%] an der	
	R-●		Zellulose	PP-Membran
66-26		4	90 / 81	95 / 94
66-27		2	96 / 92	94 / 92
66-28		2	< 1 / < 1 ^d	< 1 / < 1 ^d
66-29		2,5	< 10 / < 5	< 10 / < 5
66-30		2	83 / 71	91 / 85
66-31a		3	44 / 37	45 / 39
66-31b		3	70 / 64 ^d	75 / 70 ^d
66-32		1,5	25 / 10 ^d	28 / 19 ^d
66-33		1,5	n.u. ^c	< 10 / 5 ^d
66-34		1,5	35 / 25 ^d	35 / 28 ^d

^a aus dem Verhältnis 66 : 67^b nach HPLC bei 220 nm^c n.u. nicht untersucht^d Zusatz von 0,1 Äq. TMSCl (bezogen auf die eingesetzte Menge an Amin)

Anilin (**66-22**) und die rein halogensubstituierten Derivate (**66-24** und **66-25**) lieferten gute Ergebnisse unter SPOT-Synthese-Bedingungen. Auch bei dem verwendeten *p*-Anisidin (**66-26**) und *p*-Phenoxyanilin (**66-27**) wurden gute Umsätze und Reinheiten erzielt. Ansonst verliefen die Synthesen mit Aminen aus dieser Gruppe mit den niedrigsten Umsätzen. Selbst Zusatz von TMSCl zur Aktivierung^[125, 126] brachte nur im Fall von α -Naphthylamin (**66-31a** und **b**) eine deutliche Steigerung, aber keinen vollständigen Umsatz. Bei sterisch gehinderten Anilinderivat (**66-23**) brachte dieser Zusatz keine Änderung. Allgemein zeigten elektronenärmere Derivate als Anilin schlechte Resultate. Die Derivate der Heteroaromaten (**66-32** bis **66-34**) lieferten ebenfalls schlechte Umsätze an beiden Membranen. Eine Verlängerung der Reaktionszeit ist im Hinblick auf den späteren parallelen Einsatz mit den Aminen der anderen Gruppen nicht praktikabel, da ungewiss ist, wie es sich auf die Gesamtproduktqualität auswirkt. Es ist daher effizienter sich bei der Synthese grosser Substanzbibliotheken auf solche Bausteine zu beschränken, die im Vortest unter Standardbedingungen gute Ergebnisse geliefert haben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 84 Amine zur Monochlorsubstitution am membran- gebundenen Dichlor-[1,3,5]-triazin **54** untersucht. Hierbei hat sich der inhärenter Nachteil der SPOT-Synthese, die geringen Produktmengen, als Problem bei der Identifizierung von einigen aufgetretenen Nebenreaktionen erwiesen. Insgesamt zeigen die Resultate der Untersuchungen jedoch, dass eine grosse Zahl an strukturell verschiedenen Aminen für die Monochlorsubstitution an membrangebundenen Dichlor-[1,3,5]-triazinen unter SPOT-Synthese-Bedingungen verwendbar sind. Sowohl an Zellulose als auch an der PP-Membran verliefen die Reaktionen in ca. 80 % aller untersuchter Fälle mit Umsätzen von mehr als 80 % (vgl. Abb. 10).

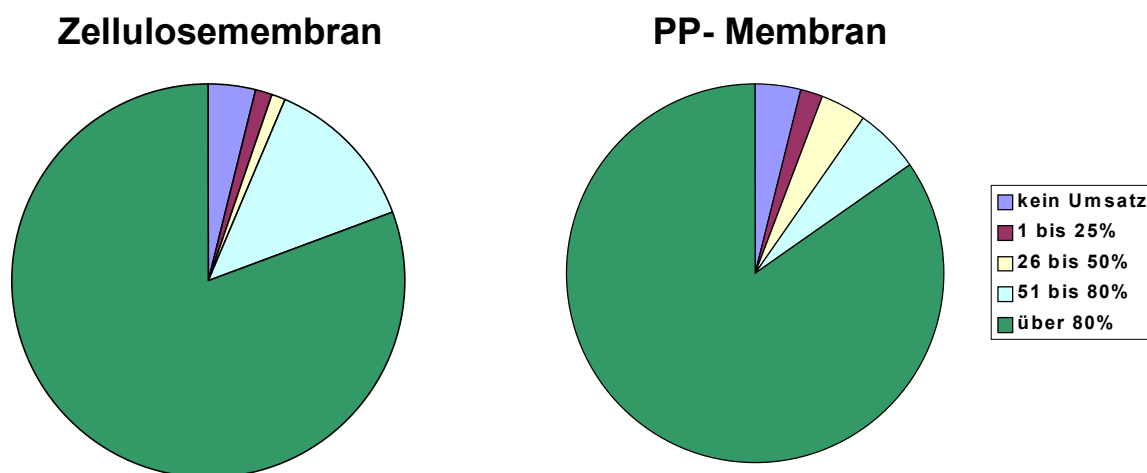


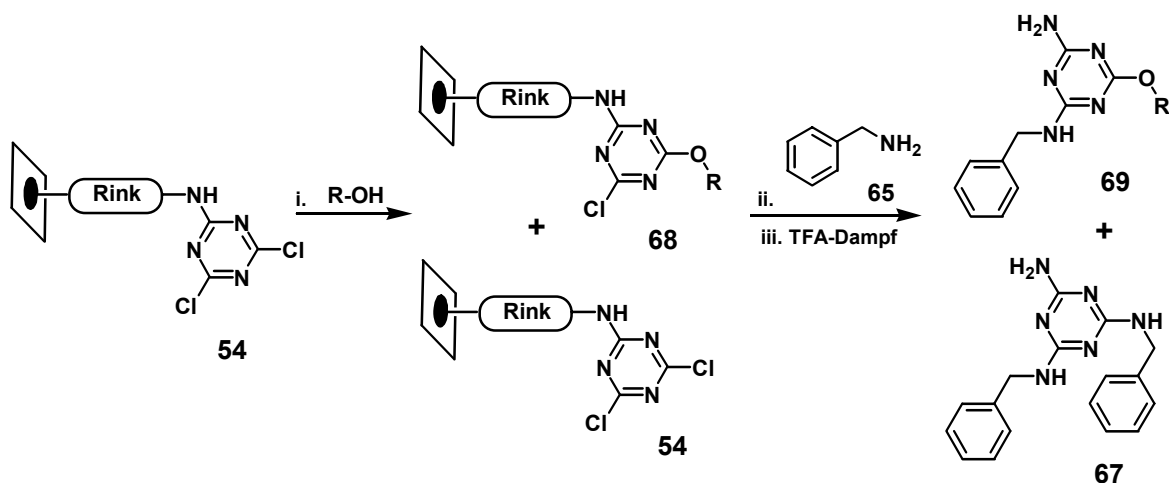
Abb. 10: Umsatzverteilung der getesteten Amine an der Zellulose- und PP-Membran.

Die Verwendung einer Schutzgruppe für Hydroxylfunktionen bei mehrfach funktionalisierten Alkylaminen ist nicht notwendig. Symmetrische Diamine können direkt eingesetzt werden, da eine Überbrückung zweier Triazineinheiten nicht beobachtet wurde. Besonders gut sind Arylamine für die Monochlorsubstitution an Dichlor-[1,3,5]-triazinen mittels SPOT-Synthese geeignet. Von den 13 getesteten Anilinderivaten sind lediglich sechs mit Umsätzen > 80 % für den Einsatz in grösseren Bibliotheken geeignet, wobei ggf. weitere insbesondere elektronenreiche Derivate verwendbar sind.

2.4.2 Verwendung von *O*-Nucleophilen unter SPOT-Synthese-Bedingungen

Zusätzlich zur Untersuchung der Verwendbarkeit von *N*-Nucleophilen sollten auch *O*-Nucleophile zur Substitution an membrangebundenen Dichlor-[1,3,5]-triazinen getestet werden. Aus den Ergebnissen von Dudley *et al.*,^[75] Falorni *et al.*^[23] und den Selektivitätsuntersuchungen der Aminoalkohole (Kapitel 2.4.1), zeigte sich, dass Hydroxylgruppen, wenn überhaupt, wesentlich langsamer die Chloratome am [1,3,5]-Triazinring substituieren als Aminogruppen.

Für die ersten Untersuchungen der *O*-Nucleophile wurde die PP-Membran als planare Oberfläche gewählt, um den Überschuss an Hydroxylgruppen der Zellulosemembran zu vermeiden. Aufgrund der Löslichkeit der verwendeten Reagenzien wurde DMSO eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur. Es zeigte sich, dass aliphatische und benzyliche Alkohole nicht oder nur mit Umsätzen unter 20 % reagierten. Der Umsatz wurde in Analogie zur Untersuchung der Amine nach Reaktion der verbliebenen Chloratome am [1,3,5]-Triazinring mit Butyl- oder Benzylamin aus dem Verhältnis trisamino- zu diamino-oxy-substituiertem Triazin bestimmt (Schema 21).



Schema 21: Untersuchungen zur SPOT-Synthese von diamino-oxy-substituiertem Triazin **69** an einer PP-Membran am Beispiel von Alkoholen mit Arylrest.

Zur Untersuchung der Reaktivität in der SPOT-Synthese wurden fünf *O*-Nucleophile (Cyclohexanol, 2,2,2-Trifluorethanol, 2-Chlorbenzylalkohol, Phenol und Pentafluorphenol) ausgewählt und unter verschiedenen Bedingungen an der Rink-Linker-modifizierte PP-Membran mit immobilisiertem Dichlor-[1,3,5]-triazin umgesetzt. Der Einsatz einer Hilfsbase ist ein kritischer Punkt; bei dem Einsatz von DBU konnte lediglich das DBU-Triazinyl-Salz nachgewiesen werden. Als Alternative wurde in einigen Fällen DIEA den entsprechenden Lösungen zugesetzt (Abb. 11).

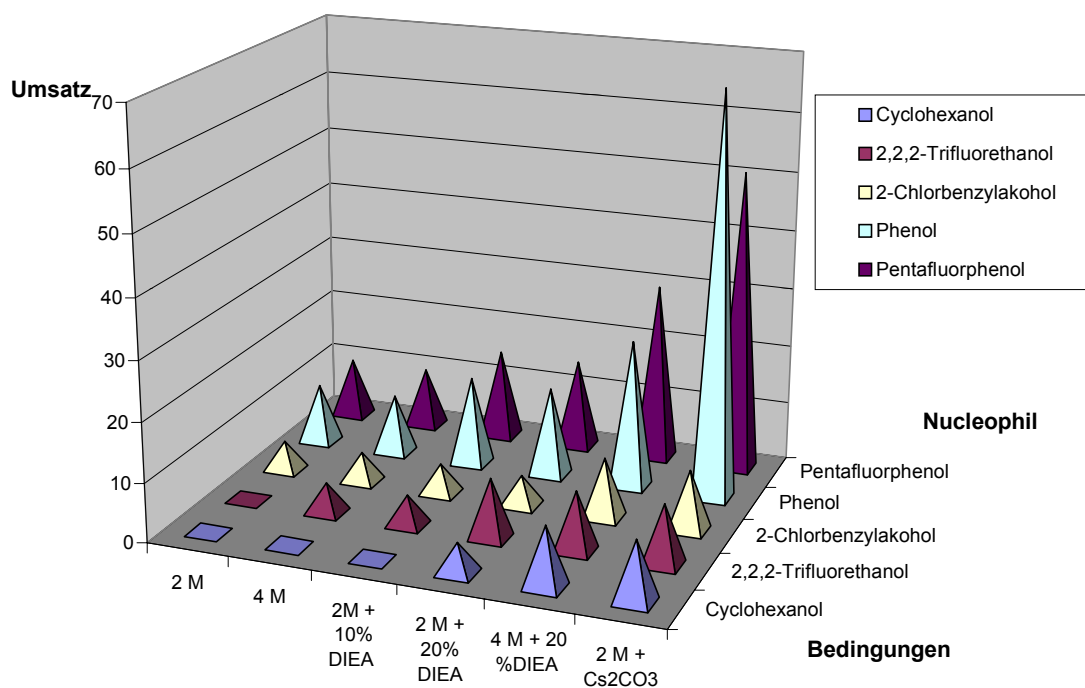
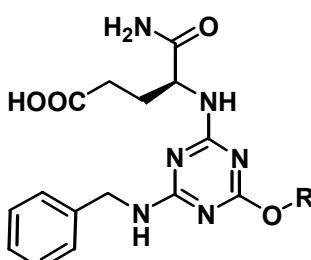
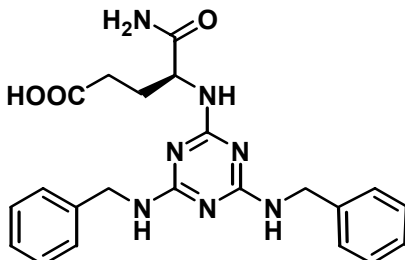
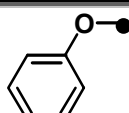
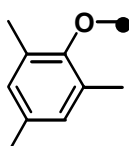
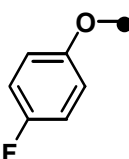
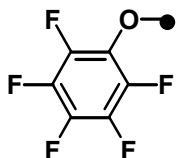
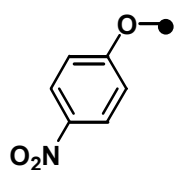
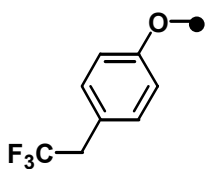
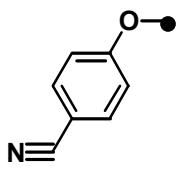
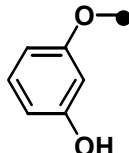


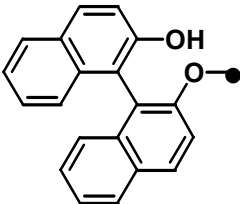
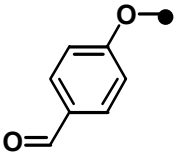
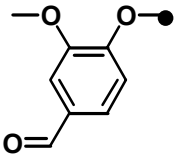
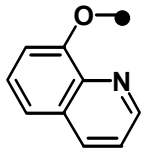
Abb. 11: Umsatz verschiedener O-Nucleophile mit Dichlor-[1,3,5]-triazin **54** an der PP-Membran.

Der Einsatz verschiedener Konzentrationen mit und ohne Base führte bei keinem der untersuchten O-Nucleophile zu einem befriedigendem Umsatz. Die Überführung der Nucleophile in die entsprechenden Cäsiumsalze^[127] in DMSO lieferte unter SPOT-Synthese-Bedingungen keine Verbesserung der Ergebnisse für Cyclohexanol, 2,2,2-Trifluorethanol und 2-Chlorbenzylalkohol. Bei den Phenolaten hingegen kam es zu einem deutlichen Anstieg des Umsatzes, so wurde mit Cäsiumphenolat bei Raumtemperatur über 60 % Umsatz erreicht. Die Verbindungen zeichnen sich durch eine geringere Polarität als die vergleichbar aminosubstituierten [1,3,5]-Trazine aus, was eine Auftrennung der Syntheseprodukte erschwerte. Zur Erhöhung der Polarität der Produkte wurde am Rink-Linker eine Glutaminsäure eingefügt und das Cyanurchlorid am N-Terminus der Aminosäure immobilisiert. Die Untersuchungen von Cäsiumsalzen weiterer Phenole zur Monochlorsubstitution unter SPOT-Synthese-Bedingungen wurden an beiden Membranen durchgeführt (Tabelle 15). Die verbliebenen Chloratome wurden nach den Umsetzungen mit den Phenolaten mit Benzylamin (Analog zu Schema 21) zur Reaktion gebracht.

Tabelle 15: Umsatz und Reinheit nach Monochlorsubstitution an membrangebundenen Dichlor-[1,3,5]-triazinen durch verschiedene Cäsiumphenolate.

			
70		71	
Nr.	Phenol R●	Konzentration [M] in DMSO	Umsatz ^a / Reinheit ^b [%] an der Zellulose PP-Membran
70-1		3	80 / 68 81 / 68
70-2		2	14 / 12 84 / 69
70-3		2	23 / 18 84 / 81
70-4		3	59 / 52 67 / 58
70-5		3	< 5 / < 5 34 / 23
70-6		3	53 / 42 86 / 82
70-7		2	< 5 / < 5 10 / 8
70-8		4	69 / 63 72 / 66

Fortsetzung Tabelle 15

Nr.	Phenol	Konzentration [M] in DMSO	Umsatz ^a / Reinheit ^b [%] an der	
	R●		Zellulose	PP-Membran
70-9		1	60 / 54	74 / 68
70-10		4	79 / 68	79 / 70
70-11		3	< 5 / < 5	61 / 49
70-12		2	20 / 10	83 / 69

^a aus dem Verhältnis 70 : 71 ^b nach HPLC bei 220 nm

Die Cäsiumsalze wurden hierfür als 1 bis 4 M Lösungen (in Abhängigkeit ihrer max. Löslichkeit) in DMSO eingesetzt. Die Reaktionszeit betrug in allen Fällen 30 min. Der Einsatz von Glutaminsäure erleichterte die Analytik bzgl. der Auftrennung. Hierbei zeigte sich eine sehr grosse Varianz in der Reaktivität der Phenolationen. Im Allgemeinen verliefen die Umsetzungen an der PP-Membran deutlich besser als an der Zellulosemembran. Dies lag vermutlich an dem Überschuss an Hydroxylgruppen der Zellulose, der zu einer verstärkten Hydrolyse der Phenolate führen kann. Dies hat zur Folge, dass niedrigere Überschüsse oder überhaupt kein Phenolat zur Reaktion mit den Dichlor-[1,3,5]-triazinen zur Verfügung standen. Von den 12 getesteten Phenolen lieferten die Hälfte Umsätze von über 75 % an der PP-Membran. Eine Verlängerung der Reaktionszeit auf über 30 Minuten lieferte keine besseren Ergebnisse. Im Gegenteil, bei längeren Reaktionszeiten konnte zusätzlich das Auftreten des doppelt chloresubstituierten Diphenoxy-[1,3,5]-triazins zu 10 bis 20 % nachgewiesen werden. Die Untersuchungen haben ergeben, dass Phenolate nur bedingt unter den limitierenden Bedingungen der SPOT-Synthese zur Monochlor-substitution an Dichlor-[1,3,5]-triazinen bei Raumtemperatur einsetzbar sind.

2.5 Nucleophile Substitution an membrangebundenen 6-Monochlor-[1,3,5]-triazinen

Die Umsetzung des letzten Chloratoms an den erhaltenden Monochlor-[1,3,5]-triazinen mit Nucleophilen erfordert sehr lange Reaktionszeiten oder erhöhte Temperaturen (vgl. Kapitel 1).^[2-4, 7, 22, 23, 75] Beide Parameter sind nur schwer oder gar nicht unter SPOT-Synthese-Bedingungen zu realisieren. Es galt eine Möglichkeit zu finden, die Chlorsubstitution in dem „offenem System“ der SPOT-Synthese durchzuführen.

2.5.1 Verwendung von Aminen unter SPOT-Synthese-Bedingungen

Bei der Realisierung der benötigten erhöhten Temperatur stösst man in der SPOT-Synthese auf zwei Probleme; dem Energietransfer zu den einzelnen SPOTs und das offene System an sich. Die geringen Volumina an Amin-Lösungen (2 µl an der Zellulose bzw. 1 µl an der PP-Membran) die verwendet werden verhindern den Einsatz konventioneller Energietransfermethoden wie etwa einer Heizplatte, da die Lösungen verdampft sind, bevor die nötigen Reaktionstemperaturen erreicht werden.

Eine Alternative zum herkömmlichem Energietransfer stellt der Einsatz von Mikrowellenstrahlung (MW) dar. Sie wurde für eine Reihe verschiedener Reaktionen in Lösung eingesetzt,^[128, 129] unter anderem auch zur Beschleunigung der S_NAr-Reaktion an Arylhalogeniden durch Amine.^[130] Um die Übertragbarkeit dieses Energietransfers auf die vorliegende Reaktion zu untersuchen wurde der Effekt der Mikrowellenbestrahlung (810 W) im Vergleich zur „traditionellen“ Erwärmung bezogen auf die Chlorsubstitution am Monochlor-[1,3,5]-triazin getestet. Der Vergleich erfolgte sowohl in Lösung, als auch an einem Synthescharz mit Rink-Linker-Triazin-Einheit (Tabelle 16).

Tabelle 16: Untersuchungen zur Chlorsubstitution an Monochlor-[1,3,5]-triazinen durch Amine unter Mikrowellenbestrahlung.

Nr.	Phase	Amin	Bedingungen	Umsatz [%] ^a
1	Lösung	Tetrahydrofurfurylamin	140°C, 24 h	50
2	Lösung	Tetrahydrofurfurylamin	Mikrowelle, 3 min	> 95
3	Synthescharz	Tetrahydrofurfurylamin	80°C, 1 h	75
4	Synthescharz	Tetrahydrofurfurylamin	80°C, 4 h	> 95
5	Synthescharz	Tetrahydrofurfurylamin	Mikrowelle, 3 min	> 95
6	Synthescharz	Cyclohexylamin	80°C, 1 h	50
7	Synthescharz	Cyclohexylamin	Mikrowelle, 3 min	> 95
8	Synthescharz	Dibutylamin	Mikrowelle, 3 min	> 95

^a aus der HPLC-Peak Fläche der Rohprodukte

Die Analytik der Produktgemische erfolgte im Fall der Synthesen in Lösung (Nr. 1 und 2) direkt aus der Synthesemischung, im Fall der Harzsynthesen (Nr. 3 - 8) aus der

Abspaltungslösung vom Rink-Linker, um etwaige Hydrolyse der Chlortriazinderivate durch weitere Aufarbeitungen zu verhindern. Die Analytik zeigt, dass der Einsatz von Mikrowellenbestrahlung die Reaktion der Amine mit den Monochlor-[1,3,5]-triazinen sowohl in Lösung (um den Faktor 500), als auch an der festen Phase (um den Faktor 80) beschleunigt.

Diese sehr guten Ergebnisse galt es nun auf die Darstellung von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken mittels SPOT-Synthese zu übertragen. Wie schon im Fall der Chlorsubstitutionen am Dichlor-[1,3,5]-triazinen wurden die zu testenden Amine in vier Gruppen unterteilt:

- (A) Alkylamine
- (B) mehrfach funktionalisierte Alkylamine
- (C) Arylamine
- (D) Anilinderivate

Die Untersuchung der beiden Gruppen mit den aliphatischen Aminen erfolgte an **72**, die der Gruppen aromatischer Amine an **73** (Abb. 12).

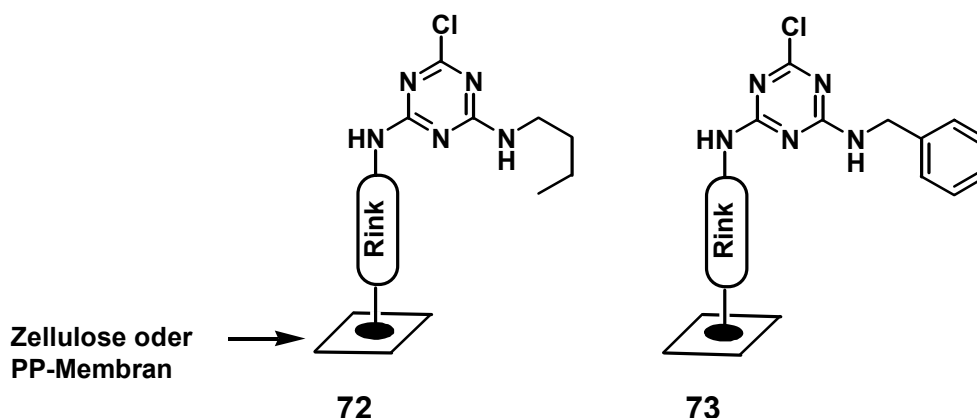


Abb. 12: Modellsysteme zur Untersuchung der Substituierbarkeit des Chloratoms von Monochlor-[1,3,5]-triazinen an Zellulose- und PP-Membran in der SPOT-Synthese.

Nach Durchführung der jeweiligen Reaktionen unter Mikrowellenbestrahlung erfolgte eine erneute Umsetzung (zwei h Inkubation bei 80°C) mit *n*-Butylamin für **72** bzw. Benzylamin für **73**, um die zuvor nicht umgesetzten Chloratome zu substituieren.

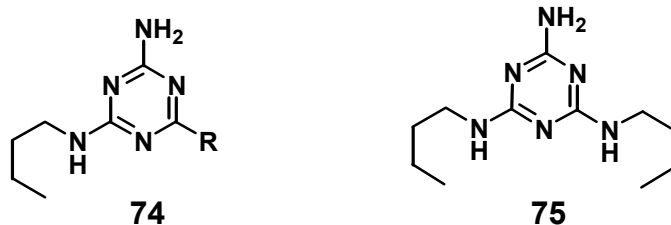
(A) Alkylamine


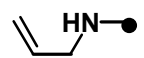
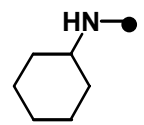
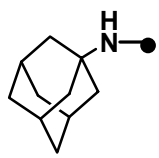
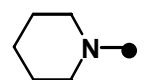
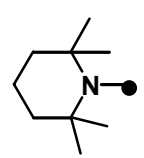
Die Untersuchungen erfolgten an einer kleinen Auswahl an Aminen (Tabelle 17). Die Reaktionsumsätze und Reinheiten wurden erneut unter SPOT-Synthese-Bedingungen an kontinuierlichen Oberflächen getestet. Amine mit einem Siedepunkt von weniger als 50°C wurden aufgrund der schlechteren Ergebnisse bei Raumtemperatur und der vermutlich raschen Verdampfung nicht eingesetzt.

Die jeweiligen Amine wurden auf die modifizierten planaren Oberflächen gespottet und im Anschluss sofort einer Mikrowellenbestrahlung ausgesetzt. Hierbei hat sich gezeigt, dass nach einer Bestrahlungszeit von mehr als drei Minuten die Aminlösung verdampft war, und die SPOTs vollständig trocken waren. Aus diesem Grund betrug die Bestrahlungszeit für

alle Amine (auch in den anderen Gruppen B-D) drei Minuten.

Tabelle 17: Umsatz und Reinheit nach Chlorsubstitution unter Mikrowellenbestrahlung an membrangebundenen Monochlor-[1,3,5]-triazin **72** durch Alkylamine.



Nr.	Amin	Konzentration [M] in NMP	Umsatz ^a / Reinheit ^b [%] an der	
	R-●		Zellulose	PP-Membran
74-1		5	99 / 95	99 / 95
74-2		5	95 / 85	n.u. ^c
74-3		5	92 / 80	98 / 90
74-4		1	10 / 5	10 / 5
74-5		5	> 99 / 98	> 99 / 98
74-6		4	< 1 / < 1	< 1 / < 1

^a aus dem Verhältnis **74** : **75**

^b nach HPLC bei 220 nm

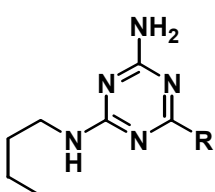
^c n.u. nicht untersucht

Die Ergebnisse der Substitution durch einfache Alkylamine unter Mikrowellenbestrahlung spiegelten die Resultate der Untersuchungen bei Raumtemperatur wieder. Bei der Substitution des Chloratoms in **72** wurden, wie bereits bei den Untersuchungen zur Monochlorsubstitution bei Raumtemperatur, gute Umsetzungen bei in α -Position unverzweigten Aminen (**74-1** und **74-2**) erhalten. Das sterische gehinderte 1-Adamantylamin (**74-4**) hingegen, welches zusätzlich eine geringe Löslichkeit aufweist, lieferte sehr geringe Umsetzungen. Wiederholtes Spotten und Bestrahlen führte zu keiner Steigerung des Reaktionsumsatzes. Cyclohexylamin (**74-3**) zeigte geringfügig bessere Ergebnisse an der PP-Membran verglichen mit der Zellosoberfläche, was insgesamt auf das Auftreten zweier Nebenprodukte zurückzuführen ist. Die Nebenprodukte liessen sich nicht durch MS-Analytik identifizieren. Die Umsetzung mit Piperidin (**74-5**) verlief an beiden Oberflächen quantitativ. 2,2,6,6-Tetrametylpiperidin (**74-6**) konnte auch unter Mikrowellenbestrahlung nicht mit dem Monochlor-[1,3,5]-triazinrest zur Reaktion gebracht werden.

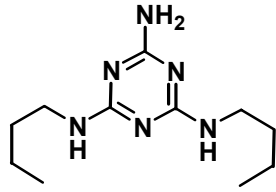
(B) mehrfach funktionalisierte Alkylamine

Die zweite Gruppe an untersuchten Aminen, bildeten die mehrfach funktionalisierten Alkylamine wie Ethylendiamin oder 2-Amino-1,3-propandiol. Wie in Kapitel 2.4.1. beschrieben, wurden Alkohole und zusätzliche Aminogruppen in den Aminen nicht geschützt. Eine Ausnahme bildete das Ethylendiamin, welches Mono-Boc-geschützt eingesetzt wurde, da diese Verbindung einen höheren Siedepunkt besitzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

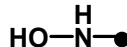
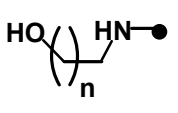
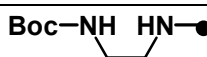
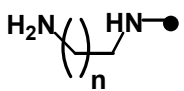
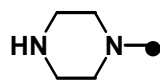
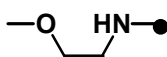
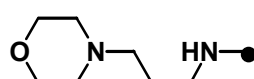
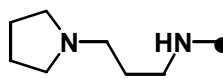
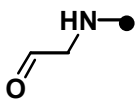
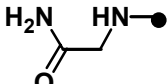
Tabelle 18: Umsatz und Reinheit nach Chlorsubstitution unter Mikrowellenbestrahlung an **72** durch mehrfach funktionalisierte Alkylamine.



74



75

Nr.	Amin		Konzentration [M] in NMP	Umsatz ^a / Reinheit ^b [%] an der		
	R-●			Zellulose	PP-Membran	
74-7			5 (H ₂ O)	95 / 85	95 / 89	
74-8		n = 1	5	99 / 94	n.u. ^c	
74-9		n = 2	5	98 / 95	98 / 96	
74-10		n = 5	5	98 / 92	98 / 93	
74-11			5	96 / 96 ^d	96 / 96 ^d	
74-12			n = 2	5	96 / 96	95 / 95
74-13			n = 3	5	93 / 89	96 / 92
74-14			n = 4	5	91 / 86	n.u. ^c
74-15	n = 5		5	94 / 87	n.u. ^c	
74-16			2	94 / 91	n.u. ^c	
74-17			5	95 / 91	96 / 96	
74-18			5	90 / 78	n.u. ^c	
74-19			5	89 / 82	n.u. ^c	
74-20			5	> 99 / 90	n.u. ^c	
74-21			3,5 (H ₂ O)	91 / 85	n.u. ^c	

Fortsetzung Tabelle 18

Nr.	Amin	Konzentration [M] in NMP	Umsatz ^a / Reinheit ^b [%] an der	
	R-●		Zellulose	PP-Membran
74-22		3 (H ₂ O)	95 / 90	93 / 82
74-23		3,5 (H ₂ O)	95 / 64	n.u. ^c
74-24		2,5 (H ₂ O)	89 / 68 ^d	n.u. ^c

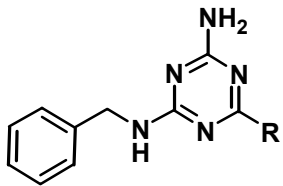
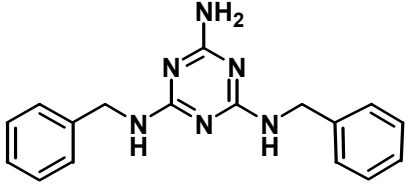
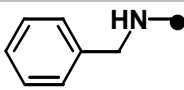
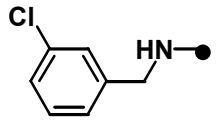
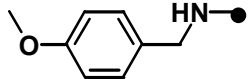
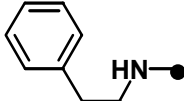
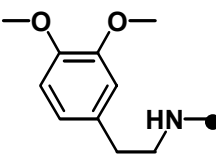
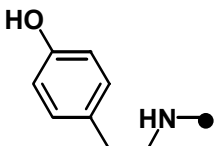
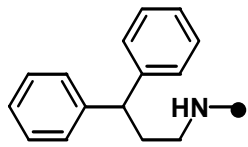
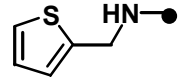
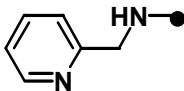
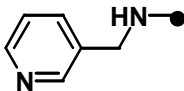
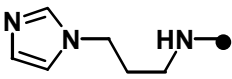
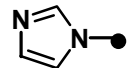
^a aus dem Verhältnis **74** : **75**^b nach HPLC bei 220 nm^c n.u. nicht untersucht^d Entschüttung im Zuge der TFA-Behandlung

Der Einsatz von Hydroxylamin (**74-7**) für die Synthese komplexer [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken unter Mikrowellenbestrahlung ist problematisch, da es eine hohe Flüchtigkeit aufweist. Beim Test von Hydroxylamin konnten so bis zu 5 % Einbau dieses Amins auch bei den auf der Membran benachbarten SPOTs nachgewiesen werden (**74-8** bis **74-10**). Alle weiteren Amine dieser Gruppe haben in den Tests zur Chlorsubstitution unter Mikrowellenbestrahlung gute bis sehr gute Ergebnisse geliefert. Bei den Umsetzungen mit prim. Diaminen (**74-11** bis **74-15**) kam es erneut im Zuge der Abspaltung der Produkte von der planaren Oberfläche mit TFA zu einer reversiblen Trifluoracetylierung. Amine mit Ether und tert. Aminogruppen lieferten bei den Untersuchung ebenso gute Resultate wie die eingesetzten Aminosäuren (**74-21** bis **74-24**). Die geringe Reinheit im Fall des Glutaminsäure(*tert.*butyl)methylester (**74-24**), bzw. der freien Säure nach TFA-Behandlung im Verlauf der Abspaltung von der Membran, ist auf eine teilweise aufgetretene Decarboxylierung zurückzuführen.

(C) Arylamine

Die dritte Gruppe der untersuchten Amine bildeten die Arylamine, die erneut nicht nur die Benzylaminderivate umfasste, sondern generell alle Amine mit einen (Hetero-)Aromaten einschloss. Die Anilinderivate wurden aufgrund ihrer allgemein geringeren Reaktivität wie bei den Reaktionen bei Raumtemperatur gesondert untersucht. Die Ergebnisse der zur Monochlorsubstitution an membrangebundenen Dichlor-[1,3,5]-triazin **73** eingesetzten 12 Arylamine sind in Tabelle 19 gezeigt. Aufgrund der Symmetrie des [1,3,5]-Triazinringes wurden die gleichen Verbindungen erhalten, wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben. Zur Vereinfachung der Diskussion der Ergebnisse wurden jedoch neue Nummern für die folgenden Verbindungen gewählt.

Tabelle 19: Umsatz und Reinheit nach Chlorsubstitution unter Mikrowellenbestrahlung an membrangebundenen Monochlor-[1,3,5]-triazin **73** durch Arylamine.

 76		 77	
Nr.	Amin R-●	Konzentration [M] in NMP	Umsatz ^a / Reinheit ^b [%] Zellulose PP-Membran
77		5	99 / 93 ^d 99 / 96 ^d
76-1		5	92 / 88 92 / 87
76-2		5	96 / 93 n.u. ^c
76-3		5	98 / 92 n.u. ^c
76-4		5	n.u. ^c 96 / 89
76-5		2	> 99 / 93 n.u. ^c
76-6		5	99 / 91 96 / 92
76-7		5	97 / 89 94 / 91
76-8		5	93 / 89 95 / 91
76-9		5	94 / 91 95 / 88
76-10		5	96 / 88 95 / 88
76-11		2	89 / 81 n.u. ^c

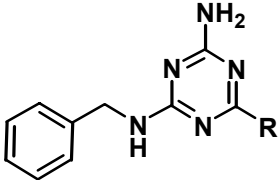
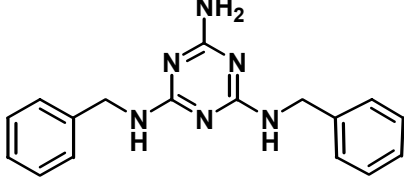
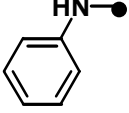
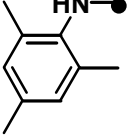
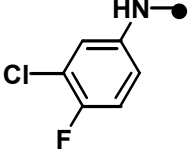
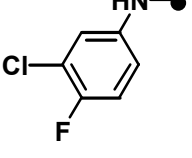
^a aus dem Verhältnis **76** : **77**^b nach HPLC bei 220 nm^c n.u. nicht untersucht^d verbliebene Chloratome mit 3-Chlorbenzylamin substituiert

Für Arylamine stellte die Mikrowellenbestrahlung ebenfalls eine äusserst effiziente Methode dar, um die Chlorsubstitution an der Modellverbindung **73** zu beschleunigen. Die Umsätze der Amine bei erhöhter Temperatur entsprachen denen bei Raumtemperatur. So verliefen die Umsetzungen mit 3,3-Diphenylpropylamin zu **66-13** (Raumtemperatur) und **76-6** (MW) zu 99 % an der Zellulosemembran oder die Reaktion mit Homoveratrylamin zu **66-9** bzw. **76-4** zu 96 % an der PP-Membran. Alle hier untersuchten Amine zeigten Umsätze von mindest. 89 % (**76-11**). Allgemein konnte kein deutlicher Unterschied bzgl. der Reaktivität zwischen „einfachen“ substituierten Arylaminen und Aminen mit Heteroaromaten beobachtet werden. Im Vergleich mit der zuvor untersuchten Chlorsubstitution bei Raumtemperatur, wurden somit dieselben hohen Reaktivitäten der Amine und vergleichbare Reinheiten der Zielprodukte unter Mikrowellenbestrahlung beobachtet.

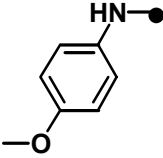
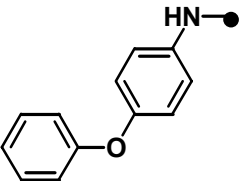
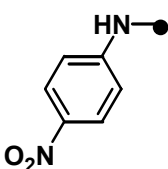
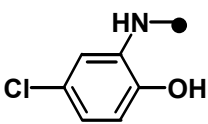
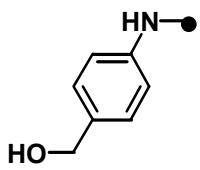
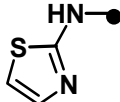
(D) Anilinderivate

Die letzte Gruppe untersuchter Amine bestand aus Anilinderivaten. Im Gegensatz zu der Testreihe zur Monochlorsubstitution am Dichlor-[1,3,5]-triazin **54** bei Raumtemperatur (vgl. Kapitel 2.4.1) wurde exemplarisch nur ein aminsubstituierter Heteroaromat getestet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 20 aufgeführt. Wie bereits für die Gruppe C wurde auch hier eine neue Numerierung der Verbindungen gewählt.

Tabelle 20: Umsatz und Reinheit nach Chlorsubstitution unter Mikrowellenbestrahlung an membrangebundenen Monochlor-[1,3,5]-triazin **73** durch Anilinderivate.

Nr.	Amin R-●	Konzentration [M] in NMP	Umsatz ^a / Reinheit ^b [%] an der	
			Zellulose	PP-Membran
	 76			
	 77			
76-12		5	90 / 90 ^c	91 / 89 ^c
76-13		2	15 / 12 ^c	15 / 13 ^c
76-14a		3,5	65 / 59	65 / 60
76-14b		3,5	95 / 91 ^c	95 / 95 ^c

Fortsetzung Tabelle 20

Nr.	Amin R ●	Konzentration [M] in NMP	Umsatz ^a / Reinheit ^b [%] an der	
			Zellulose	PP-Membran
76-15		4	96 / 91 ^c	96 / 91 ^c
76-16		2	95 / 92	94 / 92
76-17		2	< 1 / < 1 ^c	< 1 / < 1 ^c
76-18		2,5	< 10 / < 5	< 10 / < 5
76-19		2	81 / 79	85 / 83
76-20		1,5	35 / 25 ^c	35 / 28 ^c

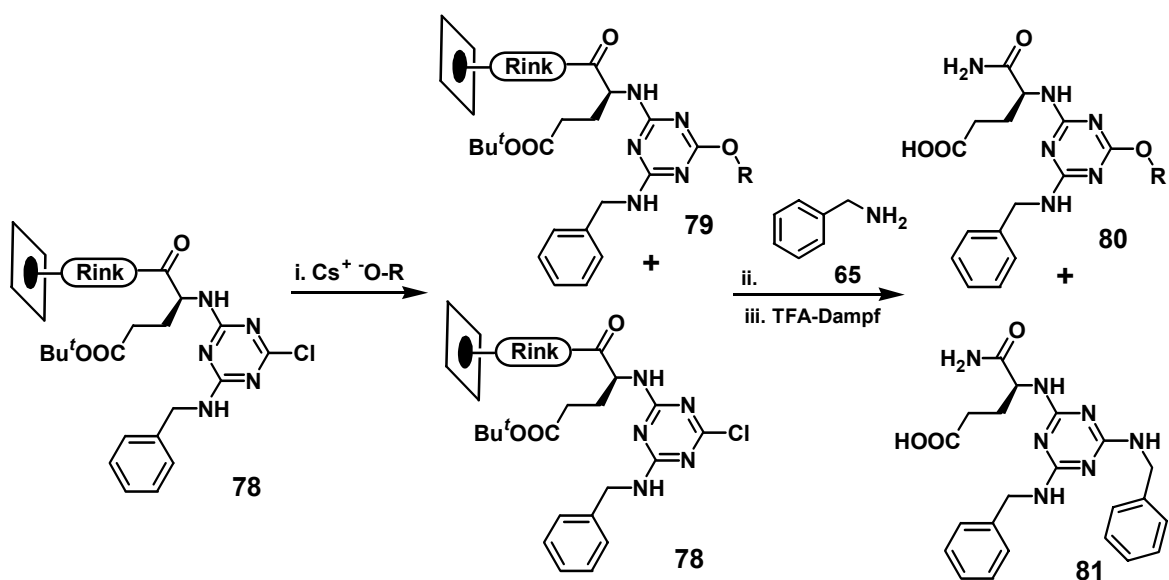
^a aus dem Verhältnis 76 : 77^b nach HPLC bei 220 nm^c Zusatz von TMSCl

Die Synthesen mit den Anilinderivaten verliefen mit deutlich besseren Ergebnissen als zuvor die Tests bei Raumtemperatur. Bei dem sterisch gehinderten 2,4,6-Trimethylanilin, dem elektronenarmen 4-Nitroanilin und 2-Aminothiazol (**76-13**, **76-17** und **76-20**) wurden erneut die schlechtesten Ausbeuten erhalten. Ein Zusatz von TMSCl (0,1 Äq. bezogen auf die eingesetzte Menge an Amin) zur Aktivierung brachte in keinem dieser Fälle eine deutliche Verbesserung. Bei vielen anderen Aminen wurde hingegen eine deutliche Steigerung (z.B. **76-14a** und **b**) beobachtet, wodurch sich ein genereller Zusatz von TMSCl empfiehlt. Eine Verlängerung der Mikrowellenbestrahlung brachte keine positiven Resultate. Die SPOTs von 2-Amino-4-chlorphenol und 4-Amino-benzylalkohol (**76-18** und **76-19**) zeigten eine schwarze Verfärbung und multiple Zersetzungsprodukte nach der Abspaltung vom Rink-Linker. Die Reinheit von **66-34** und **76-20** war identisch, so dass die Verwendung des Thiazols zur Substitution an Chlor-[1,3,5]-triazinderivaten ungeeignet scheint. Gleiches gilt für 2,4,6-Trimethylanilin (**66-23** und **76-13**) und 4-Nitroanilin (**66-28** und **76-17**). Bei der Synthese grosser Substanzbibliotheken sollte man sich auf die Verwendung von Anilin, *p*-Anisidin, 3-Chlor-4-fluoranilin und 4-Phenoxyanilin unter Zusatz von TMSCl beschränken.

In der SPOT-Synthese bestand bislang ein Problem bei der Durchführung von Reaktionen bei erhöhter Temperatur. Lediglich die gesamte Membran konnte durch Inkubation mit einer Lösung und kompletter Erwärmung behandelt werden. Mit der Mikrowellenbestrahlung wurde eine Methode gefunden, die einen raschen Energietransfer bietet und den punktuelle Einsatz unterschiedlicher Reagenzien auf den planaren Oberflächen bei erhöhter Temperatur ermöglicht. Die Untersuchungen zur Umsetzung verschiedener Amine mit den Monochlor-[1,3,5]-triazinen **72** und **73** ergaben, dass der Einsatz von Mikrowellenbestrahlung sowohl an Zellulose- als auch an PP-Membranen in fast allen Fällen zu nahezu vollständigen Umsetzungen geführt hat. An der Zellulosemembran wurden insgesamt 44 Amine getestet, davon lieferten 37 Umsätze von mehr als 85 %. Von den 30 untersuchten Aminen an der PP-Membran zeigten 24 Umsätze über 85 %. Interessanterweise konnte kein Unterschied im Reaktionsverhalten zwischen den beiden planaren Oberflächen bei den verwendeten Aminen festgestellt werden.

2.5.2 Verwendung von Phenolaten unter SPOT-Synthese-Bedingungen

Zusätzlich zu den Aminen wurden Phenole als Diversitätsquelle zur Substitution an Monochlor-[1,3,5]-triazinen für die Synthese entsprechender Bibliotheken verwendet. Aliphatische und benzyliche Alkohole wurden aufgrund der schlechten Ergebnisse an dem reaktiveren Dichlor-[1,3,5]-triazin **54** nicht in weitere Untersuchungen einbezogen. Ein Vorteil der Chlorsubstitution am Monochlor-[1,3,5]-triazin **78** ist, dass ein genaues Einstellen der richtigen Reaktionszeit wie z.B. bei dem Dichlor-[1,3,5]-triazin **54**, wobei einer zu lange Reaktionszeiten das doppelt chlorsubstituierte Diphenoxy-[1,3,5]-triazinprodukt auftrat, nicht notwendig ist. Die Durchführung erfolgte in Analogie zu den Untersuchungen der Arylamine (Schema 22).

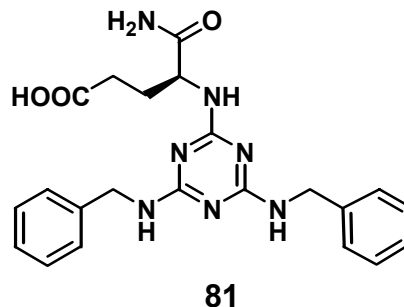
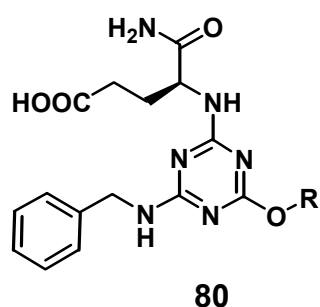


Schema 22: Untersuchungen der Cäsiumphenolate zur Chlorsubstitution am Monochlor-[1,3,5]-triazin unter Mikrowellenbestrahlung.

Es wurden die selben Phenolate bzgl. der Chlorsubstitution an **78** untersucht wie zuvor bei den Untersuchungen bei Raumtemperatur (Kapitel 2.4.2). Nach dem Spotten der entsprechenden Lösungen auf die Zellulose- bzw. PP-Membran wurde eine Reaktionszeit von drei Minuten unter Mikrowellenbestrahlung in Analogie zu den Untersuchungen der

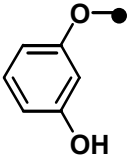
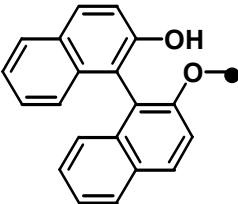
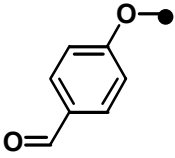
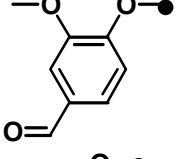
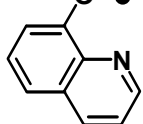
Amine (Kapitel 2.5.1) gewählt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 21 gezeigt.

Tabelle 21: Umsatz und Reinheit nach Chlorsubstitution unter Mikrowellenbestrahlung an membrangebundenen Monochlor-[1,3,5]-triazin **78** durch Cäsiumphenolaten.



Nr.	Phenol	Konzentration [M] in DMSO	Umsatz ^a / Reinheit ^b [%] an der	
	R-●		Zellulose	PP-Membran
80-1		3	96 / 95	96 / 95
80-2		2	73 / 59	84 / 79
80-3		2	95 / 92	98 / 98
80-4		3	59 / 51	60 / 53
80-5		3	50 / 25	80 / 64
80-6		3	90 / 75	96 / 91
80-7		2	85 / 75	90 / 82

Fortsetzung Tabelle 21

Nr.	Phenol	Konzentration [M] in DMSO	Umsatz ^a / Reinheit ^b [%] an der	
	R-●		Zellulose	PP-Membran
80-8		4	73 / 59	76 / 68
80-9		1	90 / 83	97 / 93
80-10		4	80 / 68	94 / 77
80-11		3	89 / 78	90 / 84
80-12		2	24 / 18	95 / 93

^a aus dem Verhältnis **80** : **81**^b nach HPLC bei 220 nm

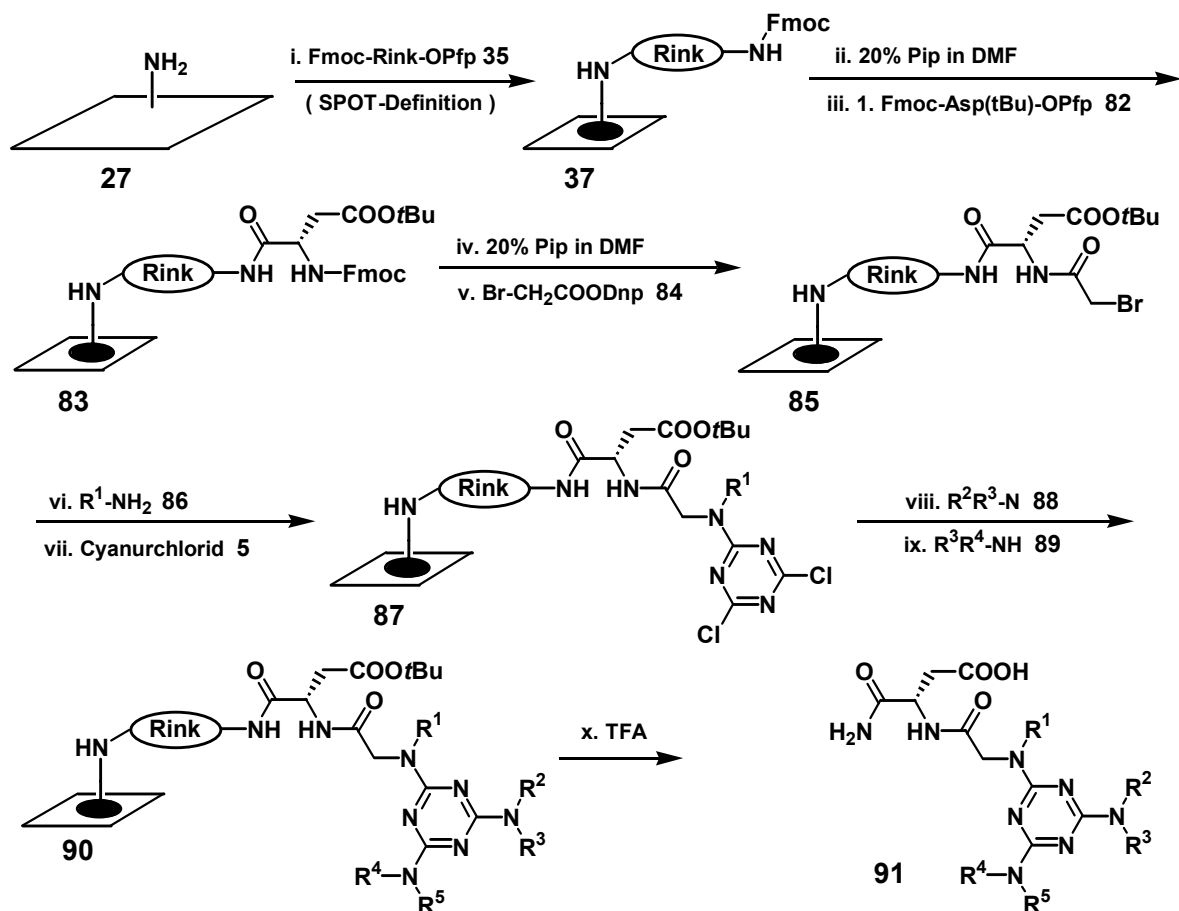
Im Gegensatz zu der Chlorsubstitution am Dichlor-[1,3,5]-triazin **54** kam es am untersuchten Monochlor-[1,3,5]-triazin **78** in fast allen Fällen an der PP-Membran zu Umsätzen von über 75 %. An der Zellulosemembran lieferten Pentafluorphenol, 4-Nitrophenol und 8-Hydroxychinolin (**80-4**, **80-5** und **80-12**) Reaktionsumsätze von höchstens 59 %. Das schlechtere Ergebnis von 8-Hydroxychinolin (**80-12**) an der Zellulose war verglichen mit dem Resultat an der PP-Membran besonders verwunderlich. Insgesamt konnten an der Zellulosemembran jedoch besser Umsätze der Phenolate unter Mikrowellenbestrahlung als bei Raumtemperatur erreicht werden.

Wie bei der Reaktion von Aminen mit Monochlor-[1,3,5]-triazinen **72** und **73**, konnte auch bei den Phenolaten die Mikrowellenbestrahlung als eine Methode zum raschen Energietransfer erfolgreich eingesetzt werden. Dies erlaubt die Synthese von Diaminophenoxy-[1,3,5]-triazinen **80** unter SPOT-Synthese-Bedingungen. Es ist möglich mittels Mikrowellenbestrahlung die Reaktivitätsunterschiede von Phenolaten an der Zellulose- und der PP-Membran aufzuheben, und einen effizienten Einsatz an beiden planaren Oberflächen zu ermöglichen. Der Einsatz von Phenolaten bietet die Möglichkeit funktionelle Gruppen wie z.B. aromatische Aldehyde in die Bibliothek zu integrieren, die nicht ohne weiteres über funktionalisierte Amine zugänglich sind. Über die Aryletherbindung lassen sich darüberhinaus sterisch anspruchsvoll substituierte Aromaten an das [1,3,5]-Triazin anknüpfen, die über das entsprechend funktionalisierte Anilin nicht

eingeführt werden können. Ein Beispiel hierfür stellt der Trimethylphenylrest, der als Phenol mit mindestens 59 % Reinheit „eingebaut“ werden kann, wohingegen das entsprechende Anilinderivat lediglich 13 % Reinheit lieferte.

2.6 Synthese von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken unter optimierten Bedingungen

Bislang wurden die verschiedenen Amine an vereinfachten Modellsystemen getestet. Die erarbeiteten Bedingungen zur Chlorsubstitution sollten im Folgenden erstmals zur Darstellung einer grösseren Bibliothek eingesetzt werden. Im Gegensatz zu den bisherigen Synthesen sollte die Darstellung der Bibliothek unter Einsatz eines Pipettierroboters zur Verteilung der Reagenzien erfolgen. Als planarer Träger wurde eine aminoderivatisierte Zellulosemembran verwendet. Als Linker wurde der Rink-Linker ausgewählt, da er ein einfaches Arbeiten (die Synthesen müssen nicht unter Lichtausschluss wie bei dem Photolinker durchgeführt werden vgl. Kapitel 2.2.3) und paralleles, ortsadressiertes Abspalten vieler Verbindungen durch TFA-Dampf ermöglicht. Eine Kompatibilität verschiedener Aminosäuren mit der nucleophilen Substitution am Dichlor-[1,3,5]-triazin durch Nucleophile konnte bereits am Syntheseharz gezeigt werden.^[29] Unter Einsatz der SPOT-Synthese sollte für die Darstellung der [1,3,5]-Triazin-Bibliothek eine Peptomereinheit, bestehend aus Aspartat an der C-terminalen Position und fünf verschiedenen Peptoid-Bausteinen, eingesetzt werden. Die allgemeine Syntheseabfolge ist in Schema 23 gezeigt.



Schema 23: Halbautomatische SPOT-Synthese der [1,3,5]-Triazin-Bibliothek mit einer C-terminalen Peptomereinheit.

Für die Synthese der Peptoid-Bausteine nach einer für die SPOT-Synthese modifizierten Sub-Monomer-Methode^[49, 51] wurden fünf Amine (R^1 -NH₂ **86** in Schema 23) eingesetzt. Durch Inkubation der gesamten Zellulosemembran mit einer 2 M Lösung von Cyanurchlorid **5** in DCM wurde der Stickstoff-Heterocyclus an dem sek. Amin immobilisiert. Anschliessend wurden 25 Amine (R^2R^3 -NH **88** in Schema 23) zur Monochlorsubstitution am Dichlor-[1,3,5]-triazin **87** eingesetzt. Das verbliebene Chloratom am Triazinring wurde mit zwei Aminen (R^4R^5 -NH **89** in Schema 23) unter Mikrowellenbestrahlung umgesetzt. Die Benennung einzelner Verbindungen der [1,3,5]-Triazin-Bibliothek **91** erfolgt durch Codierung der in den einzelnen Schritten eingesetzten Bausteine. Die Amine der Peptoidsynthese und die Amine für die Monochlorsubstitution bei Raumtemperatur sind in Abb. 13 gezeigt. Die Substitution unter Mikrowellenbestrahlung erfolgte mit Benzylamin **65** (\equiv C-01) und Piperidin **59** (\equiv C-02). Die Verbindung **91-(1-1-1)** trägt die Substituenten Benzyl (A-019), Acetaldehyd (B-01) und Benzyl (C-019) (Abb. 13).

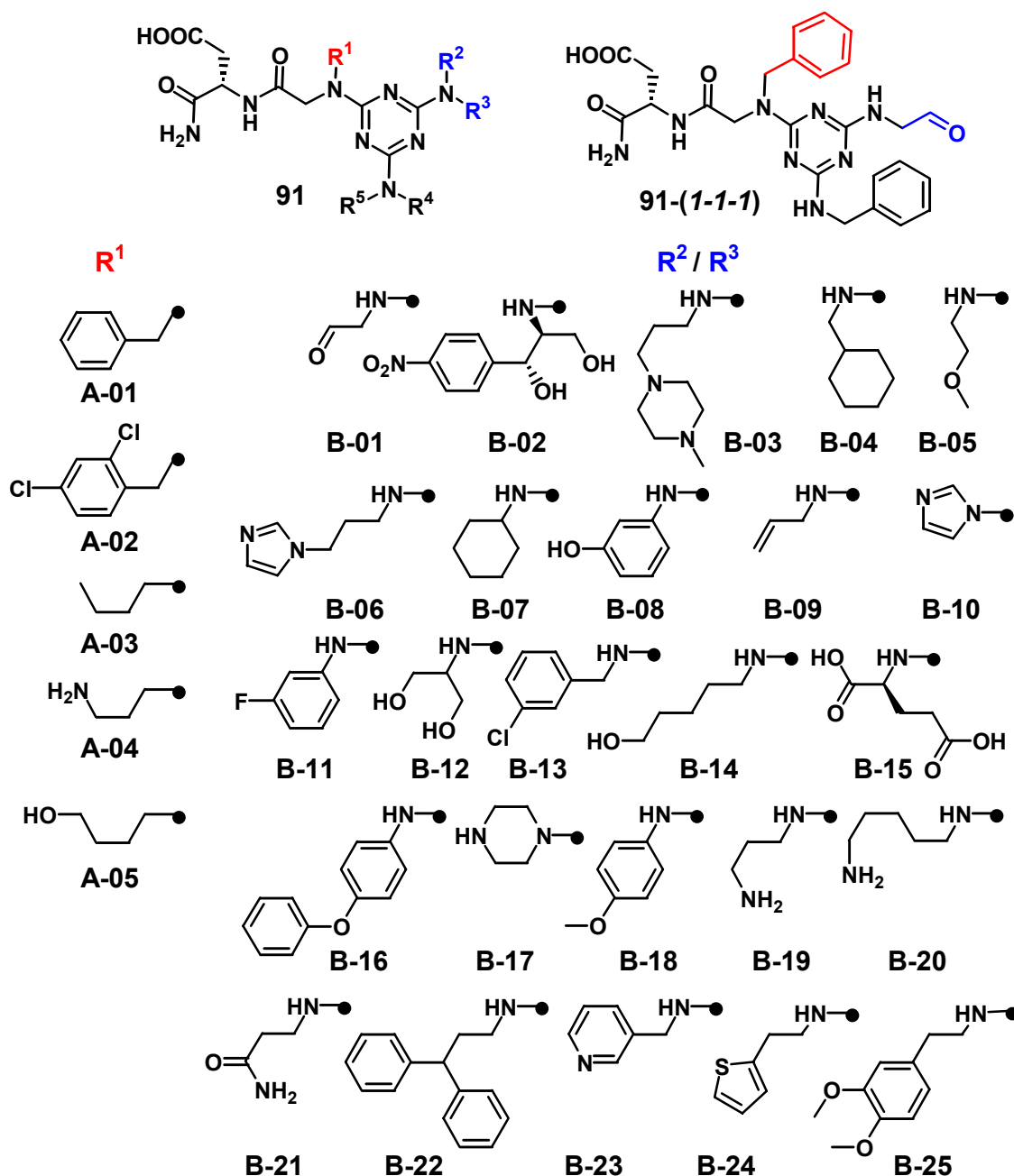


Abb. 13: Die eingesetzten Amine in der Peptoidsynthese (R^1) und zur Monochlorsubstitution am Dichlor-[1,3,5]-triazin bei Raumtemperatur (R^2 / R^3).

Insgesamt wurde eine [1,3,5]-Triazin-Bibliothek bestehend aus;

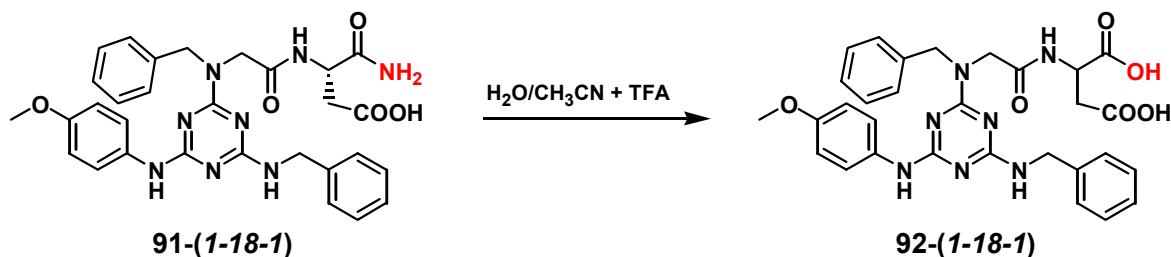
$$5 (R^1NH_2) \times 25 (R^2R^3NH) \times 2 (R^4R^5NH) = 250 \text{ Verbindungen}$$

erhalten. Der folgende Arbeitsschritt bestand aus der Abspaltung der Verbindungen vom Rink-Linker an der Zellulosemembran. Hier zeigte sich der Vorteil der Gasphasen TFA-Abspaltung; im Gegensatz zur herkömmlichen Methode musste nicht 250-mal ein definiertes Volumen TFA-Lösung pipettiert werden, sondern es konnten bis zu 50 SPOTs (begrenzt durch die Grösse des vorhandenen Exsikkators) parallel mit TFA-Dampf abgespalten werden. Die Aufarbeitung gestaltete sich darüberhinaus deutlich einfacher, ein effizientes Entfernen der TFA von den SPOTs erfolgte innerhalb von ca. 15 Minuten im leichten Vakuum, anders als bei Abspaltungen in Lösung wo mitunter 60 Minuten bei erhöhter Temperatur im Hochvakuum erforderlich sind.

Für die Darstellung der 250 Verbindungen durch die optimierte SPOT-Synthese wurden lediglich drei Tage benötigt. Einen viel grösseren Aufwand erfordert hingegen die Analytik der gesamten Verbindungen. Wird von jeder Verbindung eine HPLC-MS-Analytik à 35 Minuten durchgeführt, so ergeben sich insgesamt über sechs Tage. Aus diesem Grund wurden nur die Hälfte alle Verbindungen analysiert. Aus bisherigen Ergebnissen (Kapitel 2.5.1) war bekannt, dass Benzylamin **65** und Piperidin **59** ähnlich gute Resultate bei der Chlorsubstitution liefern. Da die Amine, die zur Monochlorsubstitution bei Raumtemperatur eingesetzt wurden, sowohl aliphatische als auch aromatische Reste enthielten, wurde die Hälfte ausgewählt, die mit **65** umgesetzt wurde (Kapitel 2.4.1).

Die Analytik ergab für nahezu alle Verbindungen sehr gute Ergebnisse bzgl. Umsatz und Reinheit. Die durchschnittliche HPLC-Reinheit der Produkte betrug 76 %. Dabei wurden die schlechtesten Ergebnisse mit nur rund 40 % Reinheit und ca. 50 % Umsatz bei den Aminosäurederivaten Glutaminsäure(*tert.*butyl)methylester **88-15** und β -Alaninamid **88-21** erhalten. Die Ergebnisse der übrigen 23 Amine zeigten jedoch, dass man mittels SPOT-Synthese eine Vielzahl unterschiedlich substituierter [1,3,5]-Triazine an der Zellulosemembran in sehr guten Reinheiten darstellen kann.

Bei der Analytik der Verbindungen wurde eine unerwartete Nebenreaktion nach der Abspaltung beobachtet. Infolge der grossen Anzahl an Proben, die in einem Gemisch aus Wasser:Acetonitril (1:1) mit 0,1 % TFA gelöst wurden, konnten einige Substanzen erst nach einigen Stunden analysiert werden. So wurde z.B. bei der Analytik von **91-(1-18-1)** neben dem erwarteten C-terminalen Amid auch die entsprechende Säure **92-(1-18-1)** gefunden (Schema 24).

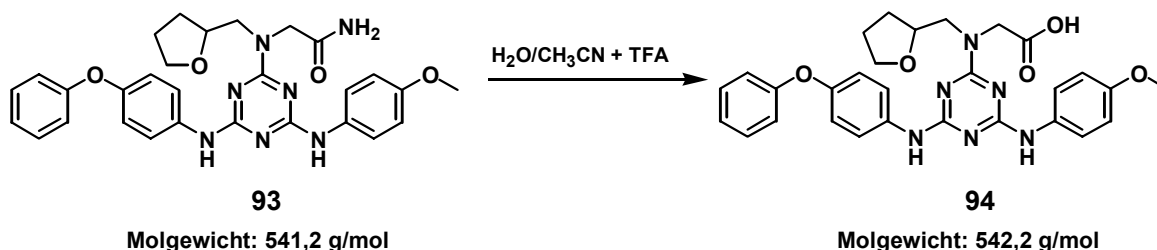


Schema 24: Hydrolyse des C-Terminus der Peptomereinheit von **91-(1-18-1)** vor der HPLC-MS Analytik.

Als Folge der Hydrolyse wurde durch das Auftreten eines zweiten Peaks in dem HPLC-Chromatogramm beobachtet. Die Substanz dieses Peaks hatte eine um eins grössere Masse und zeigte in MS²-Experimenten nicht eine -17 (Abspaltung von Ammoniak am C-terminalen Amid), sondern eine -18 (Abspaltung von Wasser am C-terminale Säure)

Fragmentierung. Der Anteil an Säure **92** schwankte von Probe zu Probe, war jedoch bei den Verbindungen mit Anilinresten am [1,3,5]-Triazinring am grössten.

Um diese Beobachtung näher zu untersuchen, wurden einige [1,3,5]-Triazine mit anilinschen Resten am Rink-Linker einer Zellulosemembran synthetisiert. Im Fall der Hydrolyse der Modellverbindung mit zwei anilinschen Resten **93** (Schema 25) konnte eine qualitative kinetische Untersuchung durchgeführt werden (Abb. 14).



Schema 25: Hydrolyse von **93** zu **94** vor der HPLC-MS Analytik.

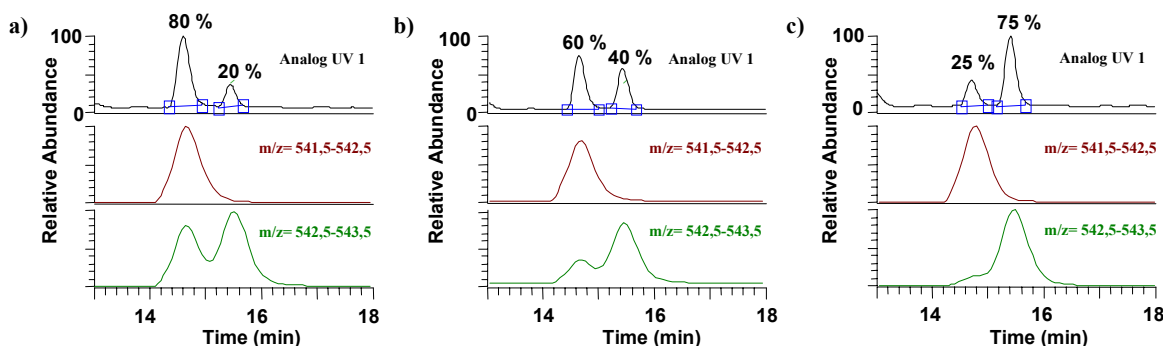


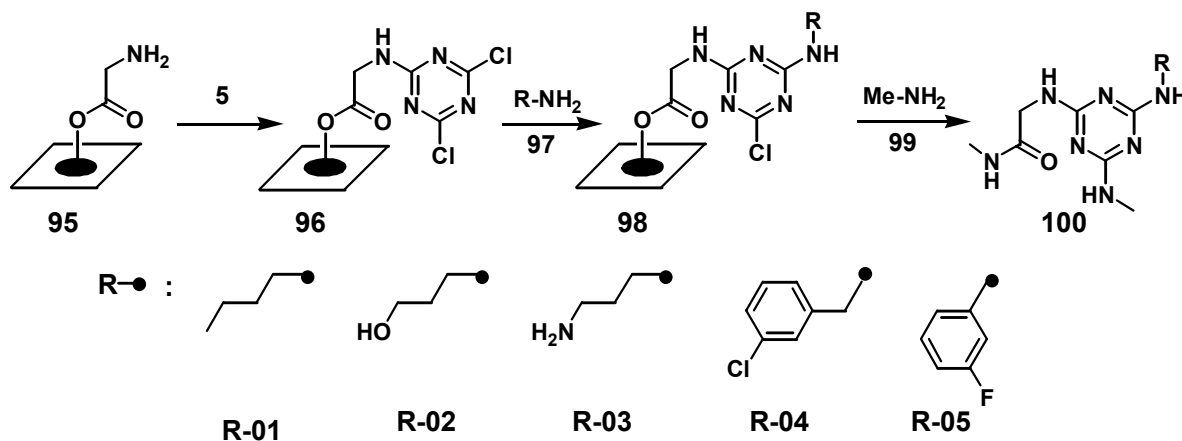
Abb. 14: Hydrolyse von **93** zu **94** in wässrigem Acetonitril mit 0,1 % TFA nach 30 (a), 120 (b) und 360 (c) min.

Für die Untersuchungen wurde **93** nach Abspaltung vom Rink-Linker in Wasser:Acetonitril (1:1) mit 0,1 % TFA aufgenommen und ein Teil direkt analysiert (Abb. 14a). Die Abb. 14 zeigt unter der UV-Spur den Massenbereich ($[M+H]^+$) des Amids **93** (Mitte, braun) und der Säure **94** (unten, grün). Bereits am Anfang konnte ein Anteil an **94** von ca. 20 % nachgewiesen werden. Nach zwei und sechs Stunden wurde die Lösung erneut analysiert (Abb. 14b und c) und es zeigte sich, dass der Anteil an **94** auf 40 bzw. 75 % angestiegen war. Im Fall nur eines anilinschen Restes am [1,3,5]-Triazinring wurde ebenfalls eine, wenn auch deutlich langsamere Hydrolyse des Amids beobachtet. Zwar konnten ebenfalls direkt nach der Abspaltung ca. 24 % Säure nachgewiesen werden jedoch war ein Anteil von 68 % erst nach 18 h erreicht.

Die Untersuchungen der Nebenreaktion haben gezeigt, dass die Hydrolyse erst nach beendeter Synthese auftrat, und abhängig von der Zeit zwischen Auflösen der Probe und Analytik war. Zur Bestimmung des Umsatzes und der erhaltenden Reinheit wurde deswegen die Summe der Signale in der HPLC-MS Analytik von dem C-terminalen Amid und der Säure betrachtet. Insgesamt zeigten die Ergebnisse dass sowohl der Rink-Linker, als auch die Zellulosemembran sehr gut für die Darstellung von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken mittels SPOT-Synthese geeignet sind.

Es stellte sich die Frage, ob auch andere Linkersysteme für die Synthese von Trisamino-[1,3,5]-triazinen unter SPOT-Bedingungen einsetzbar sind. Begonnen wurde mit der

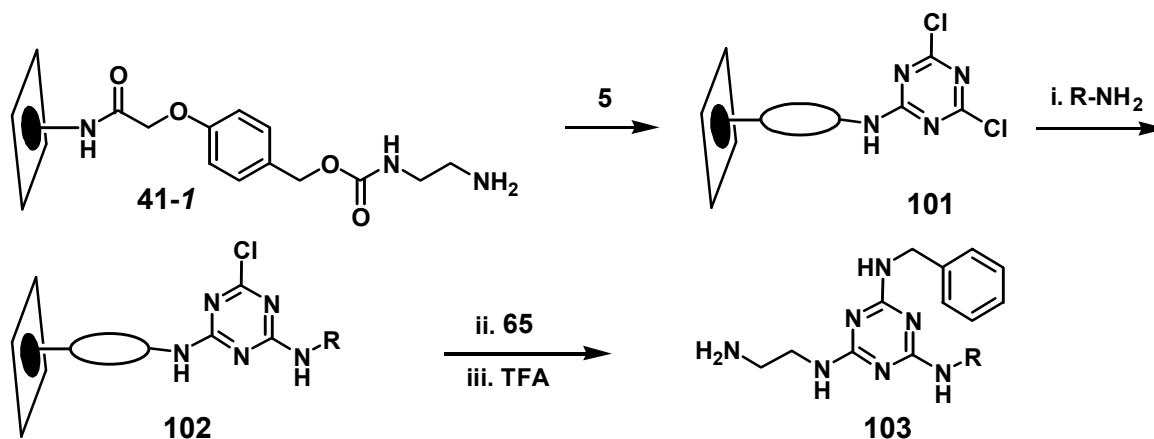
Synthese an der Glycin-Ester derivatisierten Zellulosemembran. An den *N*-Terminus des Glycins von fünf SPOTs wurde Cyanurchlorid **5** immobilisiert und im Anschluss wurden fünf Amine **97** zur Monochlorsubstitution eingesetzt. Als Nebenreaktion kann die Abspaltung der Verbindungen durch Aminolyse der Esterbindung mit den Aminen erfolgen. Um die einzelnen Amine auf diese Nebenreaktion hin zu untersuchen, erfolgte nicht wie sonst die Substitution des verbleibenden Chloratoms bei erhöhter Temperatur, sondern die Verbindungen wurden direkt mit gasförmigem Methylamin **99** im Verlauf von 14 h von der Zellulosemembran abgespalten. Im Zuge dieses Syntheseschrittes kam es zusätzlich zur Abspaltung zu der Substitution des Chloratoms durch **99** (Schema 26).



Schema 26: Einsatz verschiedener Amine zur Darstellung von fünf Trisamino-[1,3,5]-triazinen am Glycin-Esterlinker.

Die HPLC-MS Analytik zeigte eine geringere Reinheit der Produkte als bei den zuvor vom Rink-Linker erhaltenen Triazinderivaten. Die Reinheit war im Fall von **100-1** (*n*-Butylamin) mit fast 75 % am höchsten, gefolgt von **100-5** (3-Fluoranilin; 69 %) und **100-4** (3-Chlorbenzylamin; 61 %). Im Fall von **100-3** (1,3-Diaminopropan; 42 %) und **100-2** (3-Aminopropanol; 24 %) wurden nur sehr geringe Mengen (ca. 10 % im Vergleich zu **100-1**) erhalten, die durch multiple nicht identifizierbare Nebenprodukte stark verunreinigt waren. In allen Fällen erfolgte die Substitution der verbliebenen Chloratome durch Methylamin **99** scheinbar quantitativ, da keine Di- oder Monochlor-[1,3,5]-triazinderivate nachgewiesen werden konnten. Jedoch wurde insgesamt eine starke Schwankung der abgespaltenen Menge beobachtet. Die geringsten Mengen wurden bei der Verwendung von 3-Amino-1-propanol, 1,3-Diaminopropan und 3-Chlorbenzylamin erhalten. Die Schwankungen in der Ausbeute der einzelnen Verbindungen ist vermutlich auf die Aminolyse der Esterbindung zur Zellulose im Zuge der Chlorsubstitution am Dichlor-[1,3,5]-triazin **96** zurückzuführen. Diese Resultate zeigen, dass der Glycin-Esterlinker nicht mit dem Einsatz von Aminen zur Synthese von [1,3,5]-Triazinderivaten kompatibel ist.

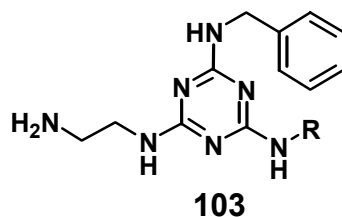
Als nächstes galt es den Carbamatlinker **41** auf seine Verwendbarkeit für die SPOT-Synthese von [1,3,5]-Triazinderivaten an der PP-Membran zu testen. Hierzu wurden exemplarisch fünf Trisamino-[1,3,5]-triazine am ethylendiaminmodifizierten Linker **41-1** synthetisiert. Nach Immobilisierung des Cyanurchlorids **5** wurden fünf verschiedene Amine zur Monochlorsubstitution verwendet. Bei dieser Untersuchung lag das Hauptaugenmerk nicht in den Umsätzen der Chlorsubstitution mit den entsprechenden Aminen, sondern vielmehr auf der generellen Durchführbarkeit der Synthese. Zur Vereinfachung wurde deswegen lediglich Benzylamin zur Substitution unter Mikrowellenbestrahlung eingesetzt (Schema 27).



Schema 27: Darstellung von Trisamino-[1,3,5]-triazinen unter Einsatz des Carbamatlinkers **41-1** an der PP-Membran.

Nach beendeter Synthese wurden die Verbindungen durch TFA-Behandlung von der PP-Membran abgespalten und mittels HPLC-MS Technik analysiert. Die Reinheiten der erhaltenden Verbindungen nach Monochlorsubstitution bei Raumtemperatur und Reaktion unter Mikrowellenbestrahlung sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

Tabelle 22: Reinheiten der Trisamino-[1,3,5]-triazine **103** nach Darstellung unter SPOT-Synthese-Bedingung und Abspaltung vom Carbamatlinker **41-1**.



Nr.	R-●	Reinheit nach der Abspaltung [%] ^a
103-1		95
103-2		90
103-3		93
103-4		91
103-5		89

^a nach HPLC bei 220 nm

Die Ergebnisse zeigen, dass der Carbamatlinker **41**, im Gegensatz zu dem Glycin-Esterlinker, sehr gut für die Synthese von [1,3,5]-Triazinen unter Einsatz diverser Amine geeignet ist. Die Reinheiten der Produkte entsprechen der am Rink-Linker synthetisierten Verbindungen. Durch den Einsatz des Carbamatlinkers ergeben sich weitere Möglichkeiten bzgl. des Substitutionsmusters am Triazinring. Dieses Linkersystem ergänzt somit den Rink-Linker für die Synthesen von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken.

2.7 Zusammenfassung; Möglichkeiten und Grenzen der *intermolekularen* S_NAr am 2,4,6-Trichlor-[1,3,5]-triazin unter SPOT-Synthese-Bedingungen

Aufgrund der speziellen Bedingungen der SPOT-Synthese, wie z.B. einer besonderen Reaktionskinetik durch Verdampfung der Lösungsmittel, ergeben sich Unterschiede zur Synthese am Harz. Der Derivatisierungsgrad der aminofunktionalisierten Membranen sollte nicht unter 200 nmol/cm² liegen, um eine ausreichende Produktmenge für Analytikzwecke sicher zu stellen. Säurelabile Linkersysteme wie der Rink- oder der Carbamatlinker haben sich als geeignet für die Darstellung von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken erwiesen. Zur Steigerung der Diversität der Bibliotheken können sowohl Aminosäuren, als auch Peptide eingesetzt werden, an deren *N*-Terminus Cyanurchlorid immobilisiert werden kann.

Für die schrittweise Substitution verbliebener Chloratome am [1,3,5]-Triazinring können verschiedene Amine eingesetzt werden. Aus den durchgeführten Untersuchungen ergaben sich folgende Kriterien die diese Amine erfüllen müssen, wenn sie in der SPOT-Synthese eingesetzt werden sollen:

- der Siedepunkt sollte über 50°C liegen
- das Amin kann sich an einem prim. oder sek. C-Atom befinden
- prim. und sek. Amine (unabhängig deren sterischer Hinderung) mit einer Löslichkeit von mindestens 1 M in NMP oder Wasser sind geeignet
- funktionelle Gruppen wie Hydroxylgruppen, Ether, Ester, Amide tert. Amine oder Nitrogruppen sind kompatibel
- weitere Amino- oder Aldehydgruppen sollten geeignet geschützt sein (nicht nötig bei symmetrischen Diaminen)
- Arylamine sollten mindestens so elektronenreich sein wie Anilin
- der Zusatz von TMSCl bei elektronenarmen Aminen ist erforderlich

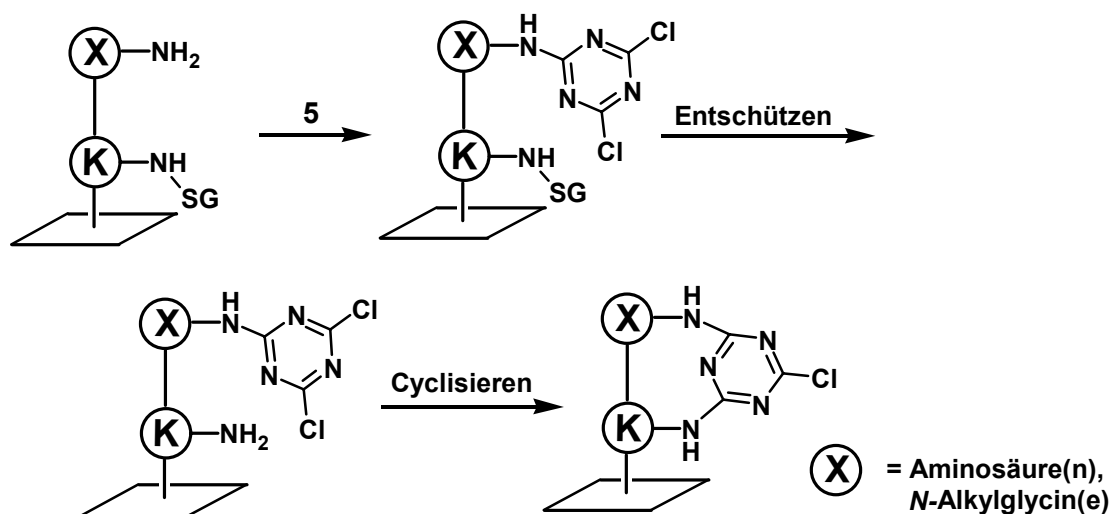
Als ungeeignet haben sich Hydrazinderivate und sterisch gehinderte Amine z.B. mit α,α' -Verzweigung herausgestellt. Für die Substitution an membrangebundenen Monochlor-[1,3,5]-triazinen hat sich die Mikrowellenbestrahlung als effiziente Methode des Energietransfers gezeigt. Bei der Substitution des letzten Chloratoms unter Mikrowellenbestrahlung durch leicht flüchtige Aminen wie z.B. Allylamin empfiehlt sich eine Wiederholung des Spottens und Erhitzens. Bei wenig reaktiven Anilinderivaten kann es hingegen zu einer Verfärbung der SPOTs kommen, weswegen bei diesen Verbindungen von mehrfacher Mikrowellenbestrahlung abgeraten wird.

Alkohole haben sich als ungeeignete Bausteine für die SPOT-Synthese von *O*-substituierten [1,3,5]-Triazinen herausgestellt. Phenole sollten in Form von Cäsiumphenolate als gesättigte Lösung in DMSO verwendet werden. Bei der Synthese von Monoxy-[1,3,5]-triazinderivaten, sollten die Phenolate zur Substitution des letzten Chloratoms unter Mikrowellenbestrahlung eingesetzt werden.

Trotz der abgeleiteten Auswahlkriterien sollten Amine und Phenole, die bislang nicht in der SPOT-Synthese eingesetzt wurden, einem chemischen Test unterzogen werden.

3 [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken durch intramolekulare S_NAr; Eine neue Cyclisierungsmethode für Peptide und Peptidmimetika

Im vorangegangenen Kapitel wurden die Synthesen unterschiedlicher [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken durch intermolekulare Substitution am Cyanurchlorid an planaren Oberflächen beschrieben. Die dort gezeigte schrittweise Substitution der Chloratome durch verschiedene Nucleophile liess den Schluss zu, dass diese Nucleophile nicht nur von unterschiedlichen, sondern auch von ein und der selben Spezies stammen können. Bei der Verwendung von Biopolymeren wie z.B. Peptiden als Träger der nucleophilen Gruppen würde sich ein interessanter Zugang zu vollkommen neuartigen makrocyclischen Verbindungen eröffnen (Schema 28).



Schema 28: Cyclisierung von linearen Oligomeren durch schrittweise nucleophile Substitution an Cyanurchlorid 5.

Ziel der folgenden Untersuchungen war es, mittels einer geeigneten Schutzgruppenstrategie möglichst verschiedene Grössen an Peptid-Triazincyclen zu synthetisieren. Als nucleophile Gruppe kamen vor allem Aminogruppen in Frage. Für die notwendige orthogonale Schützung bot sich die Boc- bzw. die Mtt-Gruppe (Entschützung durch Säuren) und die Fmoc-Gruppe (Entschützung durch Nucleophile) bei der Peptidsynthese an, wobei der Photolinker eine sichere Verankerung zur planaren Oberfläche bietet. Es sollten zugängliche Ringgrössen, Einflüsse verbleibender funktioneller Gruppen in den Cyclen auf den Ringschluss, unterschiedliche oligomerer Strukturen als lineare Vorläufer und verschiedene Cyclisierungsarten wie z.B. „N-Terminus zur Seitenkette“ und „Seitenkette zur Seitenkette“ untersucht werden.

Ein potentieller Einsatzbereich für diese Methode stellt die Entwicklung von Peptidmimetika dar. Hierbei ist häufig das Ziel eine Peptidsequenz in Verbindungen mit grösserer proteolytischer Stabilität, Selektivität oder Aktivität zu transformieren.^[65, 131] Es wurden Strategien entwickelt, solche Peptidmimetika durch den Einbau von nicht-natürlichen Aminosäuren, Einsatz von Amidbindungsisosteren oder Cyclisierung zugänglich zu machen.^[56] Speziell durch die Cyclisierung von biologisch aktiven Peptiden kann man nicht nur deren Stabilität im Serum erhöhen, sondern vermag auch die entscheidende Konformation einzufrieren.^[132] Ein zentrales Problem bei diesem Vorgehen ist jedoch, dass nur sehr selten die „richtige“ Konformation und optimale Grösse des cyclischen Peptides oder Peptidmimetikums bekannt sind. Es ist deshalb wichtig eine Methodik zu entwickeln, die sich auf eine Vielzahl von linearen Oligomeren und für viele Ringgrössen anwenden lässt.

3.1 Einfluss der Ringgrösse auf die Effizienz der Cyclisierung

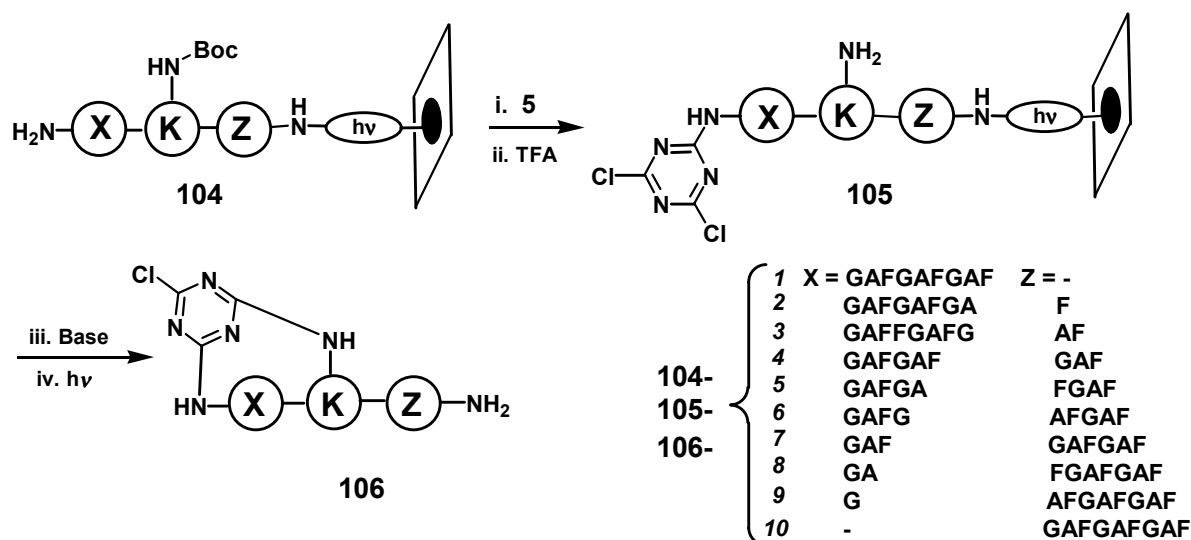
Am Anfang der Untersuchungen stand neben der Frage der prinzipiellen Durchführbarkeit der intramolekularen Substitution an Dichlor-[1,3,5]-triazinderivaten auch die Zugänglichkeit unterschiedlicher Ringgrössen. Die durch diese Methode erreichbaren Ringgrössen werden durch den Abstand der Aminogruppen in der linearen Sequenz bestimmt, die zur Substitution der Chloratome am Cyanurchlorid **5** eingesetzt werden sollen. Es wurden zwei Zugänge zur Darstellung unterschiedlicher Ringgrössen untersucht, wobei der jeweilige *N*-Terminus und die ϵ -Aminogruppe einer Lysin-Seitenkette als nucleophile Gruppen eingesetzt wurden:

- A) Variation des Abstandes zwischen dem *N*-Terminus und der ϵ -Aminogruppe des Lysins bei konstanter Sequenzlänge durch Verschieben des Lysins.
- B) Variation des Abstandes zwischen dem *N*-Terminus und der ϵ -Aminogruppe des Lysins bei variabler Sequenzlänge durch schrittweises „Entfernen“ von Aminosäuren.

Zur Bestimmung der minimal erreichbaren Ringgrösse wurde im Anschluss das Lysin gegen Analoga mit verkürzter Seitenkette ersetzt.

3.1.1 Variation der Cyclengrösse bei konstanter Sequenzlänge

Die ersten Untersuchungen zur Darstellung von cyclischen Peptidmimetika mit unterschiedlicher Ringgrösse bestanden in der Variation der Abstände der Verknüpfungspunkte zur Cyclisierung bei konstanter Länge der Peptidsequenz. Bei der Cyclisierung durch sequentielle S_NAr von Aminogruppen eines linearen Oligomers am Cyanurchlorid **5** wurde die Ringgrösse durch den Abstand der beiden verwendeten Aminogruppen festgelegt. Eine Position wurde durch den *N*-Terminus festgelegt, die zweite Aminogruppe wurde aus der ϵ -Funktion der Lysinseitenkette erhalten. Die Position des Lysins wurde beginnend vom *C*-Terminus in Richtung *N*-Terminus in der linearen Sequenz eines Modellpeptides schrittweise verschoben. Für die Untersuchungen zur Zugänglichkeit der verschiedenen Ringgrössen wurde eine einfache Modellsequenz gewählt. Das Modellpeptid sollte neben der zum Ringschluss einzusetzenden ϵ -Aminogruppe des Lysins keine weiteren Seitenkettenfunktionalitäten, die zu Nebenreaktionen führen konnten, enthalten. Der grösste Makrocyclus nach der intramolekularen nucleophilen Substitution am *N*-terminalen Dichlor-[1,3,5]-triazinrest sollte zehn Aminosäuren einschliessen. Somit wurde als erstes das Dekapeptid „GAFGAFGAFK“ gewählt. Zur Untersuchung verschiedener Ringgrössen wurden neun weitere Peptidsequenzen mittels SPOT-Synthese an der Zellulose- und PP-Membran dargestellt, bei denen systematisch Lysin vom *C*-Terminus in Richtung *N*-Terminus „verschoben“ wurde (Schema 29).



Schema 29: Variation der Cyclengrösse in **106** unter Verwendung eines Lysin-Scans durch die Peptidsequenz **104** und Umsetzung mit Cyanurchlorid **5**.

Als Linkersystem wurde der Photolinker **51** (vgl. Kapitel 2.2.3) gewählt. Die ϵ -Aminogruppe des C-terminalen Lysins wurde Boc-geschützt eingesetzt. Cyanurchlorid **5** wurde an den freien N-Terminus der Peptide immobilisiert und die Boc-Schutzgruppe der ϵ -Funktion des Lysins mit TFA entfernt. Der erste Versuch einer Cyclisierung erfolgte durch Inkubation der Membranen in einer 20 %-igen Lösung von DIEA in NMP. In Analogie zur intermolekularen Reaktion wurde eine Reaktionszeit von 30 Minuten gewählt. Nach Abspaltung der Verbindungen von der planaren Oberfläche wurde die Reinheit und Identität mittels HPLC-MS-Analytik bestimmt (Tabelle 23).

Tabelle 23: Reinheiten der unterschiedlichen Makrocyclen nach einem Lysin-Scan in der Peptidsequenz und Umsetzung mit Cyanurchlorid an der Zellulose- und PP-Membran.

Nr.	Peptidsequenz	Reinheit nach Cyclisierung an der	
		Zellulose [%] ^a	PP-Membran [%] ^a
106-1	GAFGAFGAFK	88	88
106-2	GAFGAFGAKF	86	85
106-3	GAFGAFGKAF	84	81
106-4	GAFGAFKGAF	81	80
106-5	GAFGAKFGAF	83	81
106-6	GAFGKAFGAF	79	78
106-7	GAFKGAFGAF	79	77
106-8	GAKFAGAFGAF	71	68
106-9	GKAFGAFGAF	25	26
106-10	KGAFGAFGAF	n.n. ^b	n.n. ^b

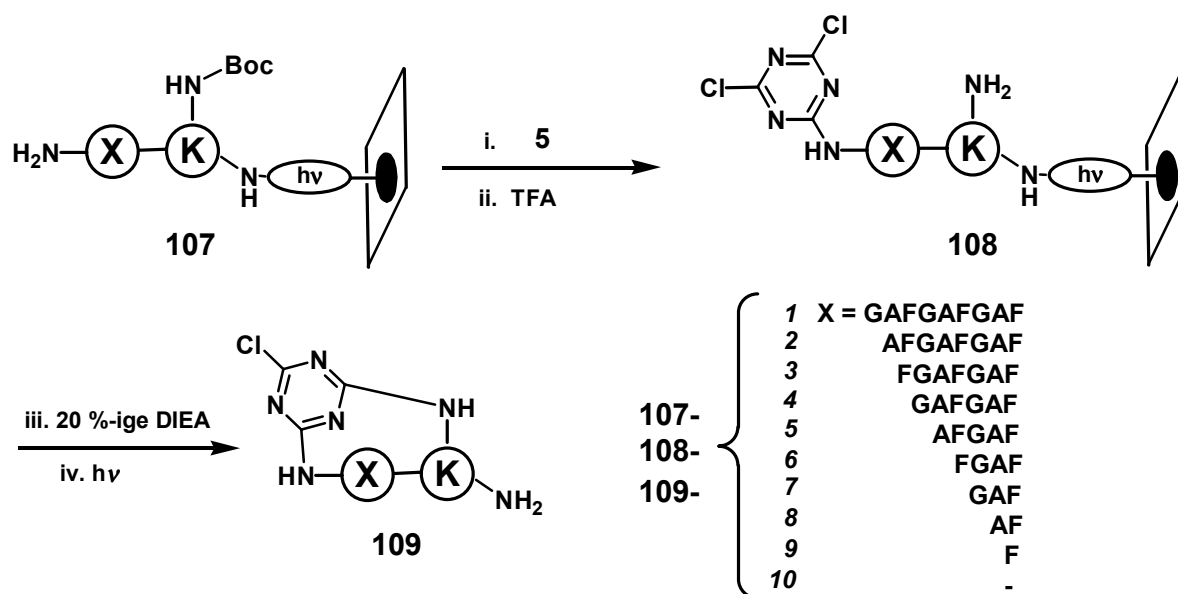
^a nach HPLC bei 220 nm

^b nicht nachweisbar

Nach Abspaltung der Produkte durch Photolyse der Membranen und Analytik mittels HPLC-MS zeigte sich, dass in fast allen Fällen das gewünschte Produkt in sehr guten Reinheiten erhalten werden konnte (**106-1** bis **106-8**). Die angegebenen Werte in der Tabelle 23 sind die Reinheiten der cyclisierten Endprodukte. Die Cyclisierung der Peptide GAFGAFGAFK bis GAKFGAFGAF (**106-1** bis **106-8**) verlief vollständig. In keinem der Fälle konnten lineare Peptid-Triazinverbindungen gefunden werden. In den Fällen **106-9** und **106-10** konnte nur eine geringe Reinheit bzw. kein Zielprodukt detektiert werden. Die Synthese der linearen Sequenz des Peptides GKAFGAFGAF (**104-9**) verlief sowohl an der Zellulose- als auch an der PP-Membran in geringeren Reinheiten (ca. 30 %) als bei den anderen Sequenzen (durchschnittlich über 85 %). Da dieses Problem an beiden polymeren Trägern auftrat, scheint dies nicht an einer einzelnen missglückten Synthese zu liegen. Eine Resynthese der linearen Sequenz mit zusätzlichen Kopplungen der entsprechenden Aminosäuren lieferte ebenfalls kein signifikant besseres Ergebnis. Im Fall der Cyclisierung des Peptides durch die ε -Aminogruppe mit einem *N*-terminalen Lysin (**106-10**) war weder an der Zellulose- noch an der PP-Membran das gewünschte Produkt nachweisbar. Eine Erklärung hierfür könnte der zu grosse Abstand zwischen der ε -Aminogruppe und der Chlortriazineinheit sein, so dass es zu keiner Reaktion kommen kann. Es wurde kein signifikanter Unterschied der Produktqualität in Abhängigkeit von der verwendeten planaren Oberfläche beobachtet. Im Folgenden sollte ein alternativer Zugang zu vergleichbaren Ringgrössen untersucht werden.

3.1.2 Variation der Cyclengrösse bei variabler Sequenzlänge

Eine alternative Darstellung möglichst unterschiedlicher Ringgrössen mittels S_NAr -Reaktion am Cyanurchlorid ist die Verkürzung der Peptidsequenz durch schrittweises Entfernen der Aminosäuren zwischen den nucleophilen Gruppen. Als Modellpeptid wurde wiederum die Sequenz GAFGAFGAFK gewählt, welches systematisch verkürzt wurde. Die resultierenden zehn Verbindungen wurden unter Verwendung des Photolinkers sowohl an der Zellulose- als auch an der PP-Membran mittels SPOT-Synthese dargestellt. Die ε -Aminogruppe des C-terminalen Lysins wurde Boc-geschützt eingesetzt. Die Immobilisierung von Cyanurchlorid **5** erfolgte nach beendeter Peptidsynthese über die freie Aminogruppe des *N*-Terminus. Die ε -Aminogruppe des Lysins wurde mit 80 %-iger TFA in DCM im Verlauf einer Stunde quantitativ entschützt. Die Cyclisierung durch nucleophilen Angriff der Aminogruppe an der Dichlor-[1,3,5]-triazineinheit wurde durch Inkubation der Membranen in 20 %-iger DIEA-Lösung in NMP für 30 Minuten erreicht (Schema 30).



Schema 30: Variation der Cyclengrösse durch schrittweise Verkürzung der Peptidsequenz und Umsetzung mit Cyanurchlorid 5.

Anschliessend wurden die Cyclen von den Membranen durch UV-Bestrahlung abgespalten und mit HPLC-MS-Technik analysiert. Die Ergebnisse der Cyclisierung bzgl. der Reinheit der erhaltenden Produkte sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 24: Reinheiten der unterschiedlichen Makrocyclen durch Verkürzung der Peptidsequenz 107 und Umsetzung mit 5 an der Zellulose- und PP-Membran.

Nr.	Peptidsequenz	Reinheit ^a nach Cyclisierung an der	
		Zellulose [%]	PP-Membran [%]
109-1	GAFGAFGAFK	89	86
109-2	AFGAFGAFK	71	78
109-3	FGAFGAFK	75	75
109-4	GAFGAFK	73	70
109-5	AFGAFK	76	70
109-6	FGAFK	65	65
109-7	GAFK	84	85
109-8	AFK	86	87
109-9	FK	76	73
109-10	K	n.n. ^b	n.n. ^b

^a nach HPLC bei 220 nm

^b nicht nachweisbar

Die Analytik zeigte, dass die Cyclisierung zu den 37- bis 13-gliedrigen Ringen (109-1 bis 109-9) quantitativ erfolgte. Bei den in guten bis sehr guten Reinheiten erhaltenden Zielverbindungen konnten keine linearen Triazin-Peptid-Derivate 108-1 bis 108-9 bzw. entsprechende Hydrolyseprodukte beobachtet werden. Lediglich Lysin selbst (109-10)

konnte nicht „cyclisiert“ werden, was vermutlich an einer zu grossen Ringspannung bzw. eine zu grossen Entfernung zwischen dem Chloratom am [1,3,5]-Triazinring und der Aminogruppe liegt. Es wurde nicht das lineare Edukt erhalten, sondern es konnten nur Zersetzungsprodukte mit unterschiedlichen Massen detektiert werden. Die Art der Zersetzung konnte nicht aufgeklärt werden. Eine einfache oder doppelte Hydrolyse der Dichlor-[1,3,5]-triazineinheit konnten allerdings ausgeschlossen werden.

Im Anschluss wurde der Einfluss der Base, ihrer Konzentration und der Reaktionszeit auf die Effizienz der Cyclisierung untersucht, um möglichst milde Reaktionsbedingungen zu erhalten. Als Modell wurde das Tripeptid Ala-Phe-Lys **107-8** verwendet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 25 zusammengefasst.

Tabelle 25: Einfluss der Base und Zeit auf die Cyclisierungseffizienz von **107-8** an Zellulosemembran.

Nr.	Base ^a	Zeit [min]	Cyclisierung [%] ^b
1	30 % DIEA	30	95 ^c
2	20 % DIEA	30	> 95
3	10 % DIEA	30	> 95
4	5 % DIEA	30	85
5	5 % DIEA	45	90
6	5 % DIEA	60	91 ^c
7	10 % DMAP	30	75 ^c
8	1 % DMAP	30	60 ^c
9	10 % DABCO	30	64
10	1 % DABCO	30	52

^a Prozentangaben in w/w

^b nach HPLC bei 220 nm

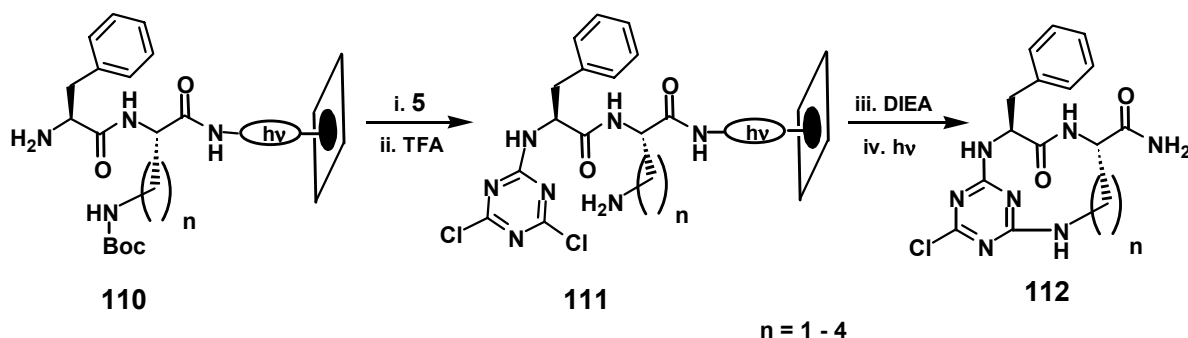
^c zusätzlich Zersetzung

Die Ergebnisse in Tabelle 25 zeigen, dass der Anteil an DIEA zur Cyclisierung auf 10 % reduziert werden kann (Nr. 3). Die Verwendung anderer Basen als DIEA wie z.B. DMAP (Nr. 7 und 8) oder DABCO (Nr. 9 und 10) ist hingegen ungünstig, da nicht nur die Cyclisierungen unvollständig ablaufen, sondern zusätzlich Hydrolyse des Dichlor-[1,3,5]-triazines auftritt. Im Verlauf weiterer Untersuchungen wurden, wenn nicht anders beschrieben, 10 % DIEA als Base eingesetzt.

3.1.3 Minimierung der erreichbaren Ringgrösse durch Verwendung von Aminosäuren mit verkürzter Aminoseitenkette

Im Verlauf der vorangegangenen Untersuchungen konnte als kleinstes Peptid das Dipeptid FK cyclisiert werden (13 Ringatome), jedoch nicht Lysin selbst (10 Ringatome). Es stellte sich nun die Frage, ob Makrocyclen zwischen 13 und 10 Ringatomen durch intramolekulare nucleophile Substitution am [1,3,5]-Triazinring dargestellt werden können. Dies wurde durch den Austausch des Lysins im Dipeptid durch spezielle nicht-natürliche Analoga mit

verkürzter Aminoseitenkette untersucht. Durch den Einsatz von Ornitin (Orn), Diaminobutter (Dbu)- und Diaminopropionsäure (Dpr) mit jeweils Boc-geschützter Aminogruppe in der Seitenkette sollten so nach Cyclisierung durch schrittweise Substitution am Cyanurchlorid 10- bis 13-gliedrige Ringe erhalten werden (Schema 31).



Schema 31: Minimierung der Ringgrösse durch Einbau von Aminosäuren mit verkürzter Aminoseitenkette in die Peptidsequenz **110**.

Parallel zu diesen Untersuchungen wurden mittels analogem Austausch des Lysins bei dem Tripeptid Ala-Phe-Lys der Einfluss der Seitenkettenverkürzung ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 26 zusammengefasst.

Tabelle 26: Reinheiten der Cyclen bei Minimierung der Ringgrösse durch Einsatz von Lysinanaloga mit verkürzten Seitenketten.

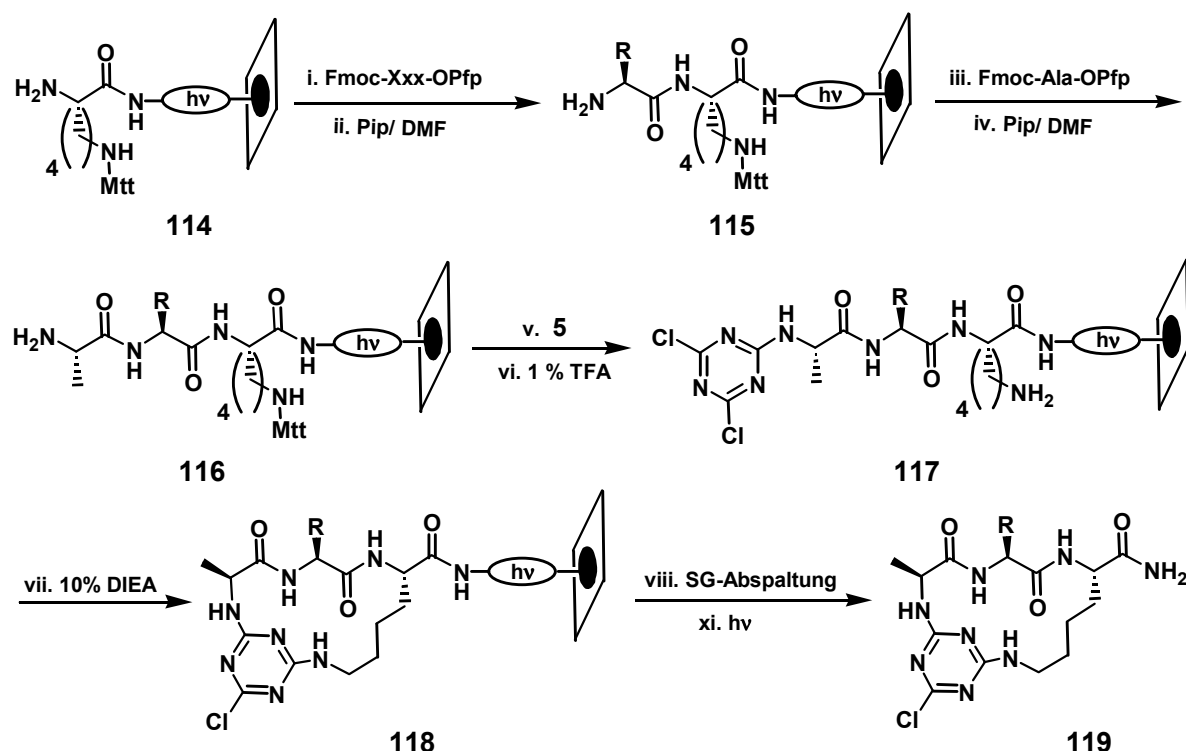
Nr.	Cyclus	Ringgrösse [Anzahl der Ringatome]	Reinheit nach Cyclisierung an der	
			Zellulose [%]	PP-Membran [%]
112-1	X = NH, n = 4	13	71	73
112-2	X = NH, n = 3	12	75	75
112-3	X = NH, n = 2	11	60	61
112-4	X = NH, n = 1	10	n.n. ^a	n.n. ^a
113-1	X = NHCH(CH ₃)CONH, n = 4	16	85	85
113-2	X = NHCH(CH ₃)CONH, n = 3	15	80	86
113-3	X = NHCH(CH ₃)CONH, n = 2	14	80	82
113-4	X = NHCH(CH ₃)CONH, n = 1	13	75	78

^a nicht nachweisbar

Die verglichen mit den Ausgangscyclus Monochlor-(F-K)-[1,3,5]-triazin um jeweils ein bzw. zwei Atom(e) kleineren Ringe mit den Aminosäuren Orn und Dbu (**112-2** und **112-3**) sind in guten Reinheiten erhältlich. In keinem der Fälle konnten lineare Derivate detektiert werden. Bei dem Versuch das Dipeptid Phe-Dpr (**112-4**) durch Reaktion mit Cyanurchlorid zu cyclisieren konnte hingegen kein Zielprodukt erhalten werden. Die Untersuchungen bestätigten die Ergebnisse aus der Verkürzung der Peptide dahingehend, dass 10-gliedrige Ringe (**112-4**) nicht mit dieser Methode der Cyclisierung zugänglich sind. Eine Verkürzung der Seitenkette an sich scheint keinen Einfluss auf den Ringschluss zu haben, solange die minimale Ringgröße von 11 Atomen nicht unterschritten wird, was die Ergebnisse bei den Verbindungen **113-1** bis **113-4** zeigen.

3.2 Kompatibilität der Cyclisierungsmethode mit proteinogenen Aminosäuren

Die Kompatibilität der neuen Cyclisierungsmethode mit den proteinogenen Aminosäuren bzw. den verwendeten Schutzgruppen ist essentiell für die allgemeine Anwendung z.B. für eine Transformation von biologisch aktiven Peptiden hin zu pharmazeutisch relevanten Peptidmimetika. Hierfür wurden in dem Tripeptid Ala-Phe-Lys die Aminosäuren Alanin und Phenylalanin getrennt gegen alle proteinogenen Aminosäuren ausgetauscht, wobei auf die Verwendung von Cystein verzichtet wurde. Die zwei resultierenden Sets aus je 19 Verbindungen mit den Sequenzen Ala-Xxx-Lys und Xxx-Phe-Lys wurden an der Zellulosemembran unter Verwendung des Photolinkers synthetisiert. Die ϵ -Aminogruppe des C-terminalen Lysins wurde Mtt-geschützt eingesetzt, um eine selektive Entschützung mit 1 % TFA in DCM mit 5 % TIPS innerhalb einer Stunde zu ermöglichen. Die Synthese und Cyclisierung ist für die Tripeptide Ala-Xxx-Lys in Schema 32 gezeigt.



Schema 32: Synthese der 19 Tripeptide Ala-Xxx-Lys und Cyclisierung an der Zellulosemembran zur Untersuchung des Einflusses der Seitenketten auf die Cyclisierungseffizienz.

Eine selektive Entschützung der zur Cyclisierung verwendeten Gruppe ist besonders für den Fall von Bedeutung, dass sich weitere geschützte nucleophile Gruppen in den Seitenketten der Peptide befinden. Die Mtt-Gruppe kann gezielt in Gegenwart von Boc-Schutzgruppen entfernt werden, um so z.B. zwischen verschiedenen (Mtt- und Boc-geschützten) Lysinen einer Sequenz zu unterscheiden. Die Reinheiten der Tripetide in der Reihe Ala-Xxx-Lys sind in Abb. 15 dargestellt.

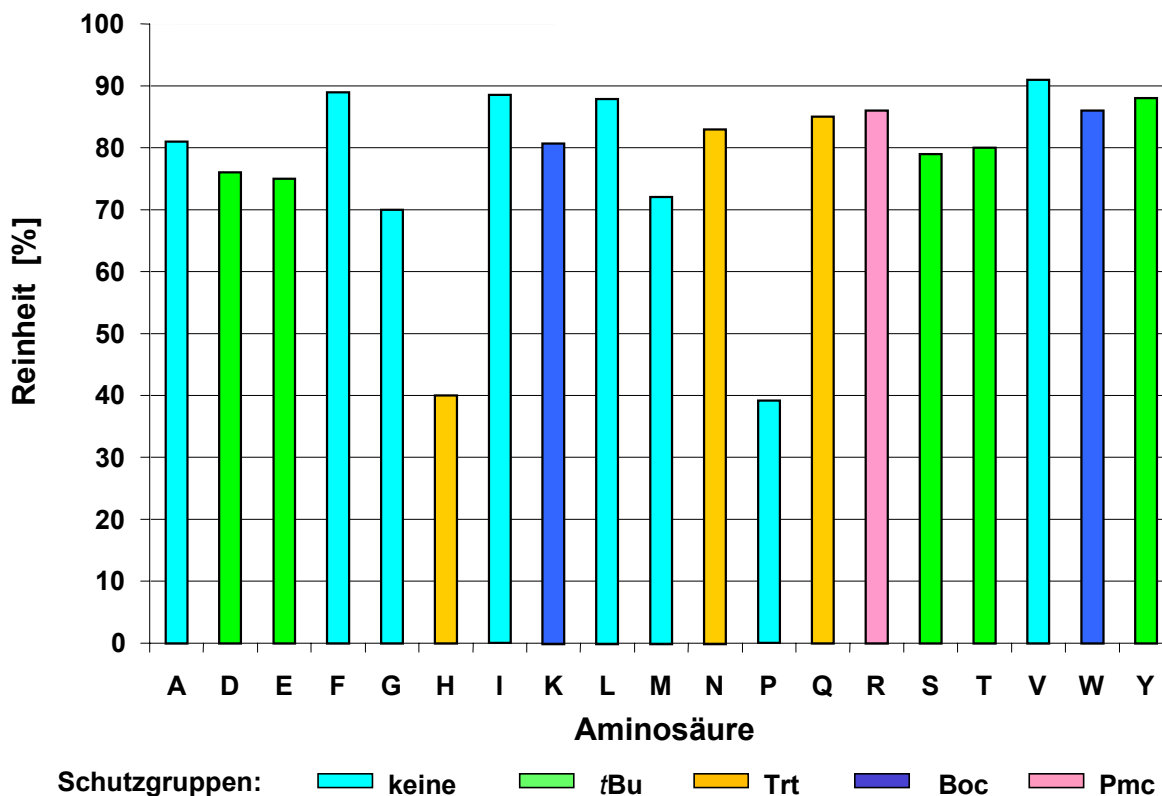


Abb. 15: Reinheiten der cyclisierten Tripeptide Ala-Xxx-Lys **119** in Abhängigkeit von den Aminosäureseitenketten bzw. Schutzgruppen.

Die 19 Aminosäuren zeigten gute bis sehr gute Ergebnisse in Bezug auf Reinheit und Cyclisierungsausbeute der 16-gliedrigen Ringe. Bei dem Einbau der Aminosäuren Histidin und Prolin wurde eine Reinheit des Zielmoleküls von weniger als 50 % beobachtet. Der Grund lag jedoch nicht in einer schlechten Cyclisierungsausbeute, sondern an einer unvollständigen Kopplung des *N*-terminalen Alanins an die Aminosäuren, und damit an der Abbruchsequenz Ac-His-Lys bzw. Ac-Pro-Lys. Unterschiede bei der Cyclisierung in Abhängigkeit von einzelnen Seitenketten oder entsprechenden Schutzgruppen konnten somit nicht beobachtet werden.

Mit den Tripeptiden des Typs Xxx-Phe-Lys sollte der Einfluss der *N*-terminalen Aminosäure auf die intramolekulare nucleophile Substitution am Dichlor-[1,3,5]-triazin untersucht werden. Das Vorgehen hierbei erfolgte in Analogie zu dem bei der vorangegangenen Untersuchung am Modell Ala-Xxx-Lys. Nach Darstellung der entsprechenden Sequenzen am Photolinker einer Zellulosemembran wurde Cyanurchlorid an den jeweiligen *N*-Termini immobilisiert. Nach Entfernen der Mtt-Gruppe des *C*-terminalen Lys wurde die Cyclisierung durchgeführt. Anschliessend wurden weiter Seitenkettenfunktionen entschützt und die Produkte von der Zellulosemembran abgespalten. Die Reinheiten der cyclisierten Tripeptide sind in Abb. 16 gezeigt.

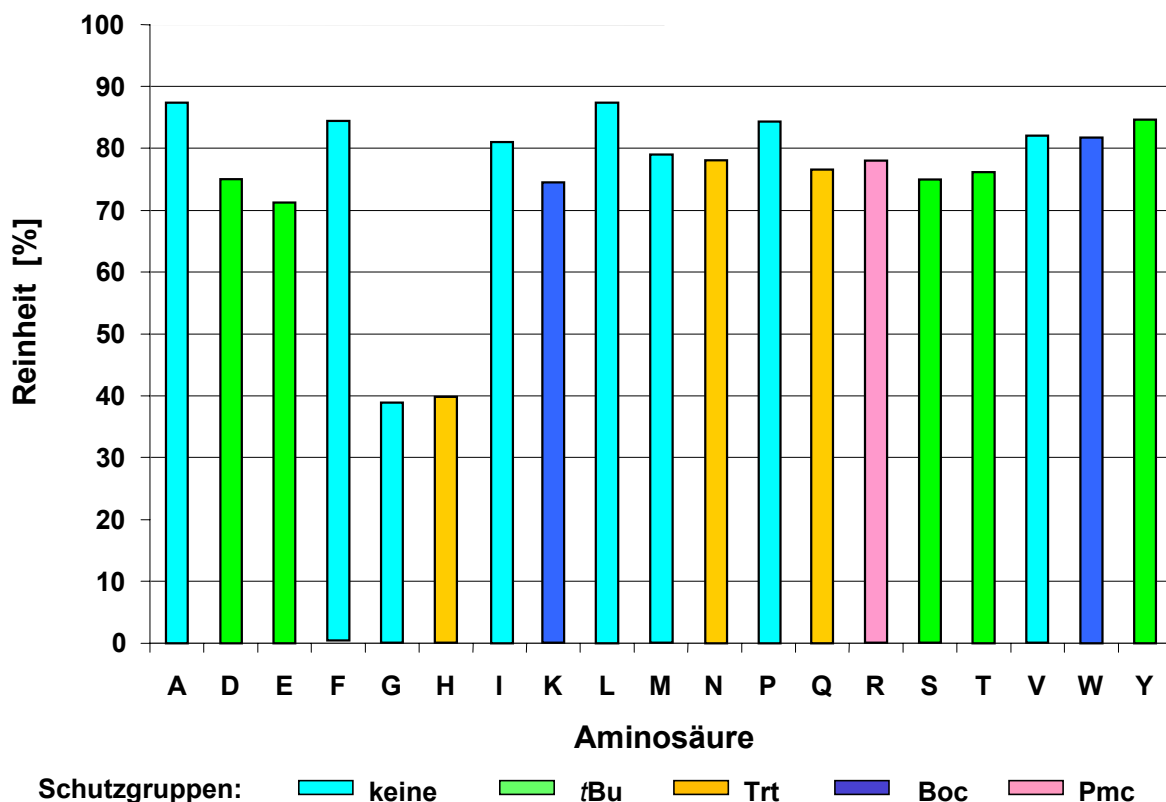


Abb. 16: Reinheiten der cyclisierten Tripeptide Xxx-Phe-Lys in Abhängigkeit von den Aminosäureseitenketten bzw. Schutzgruppen.

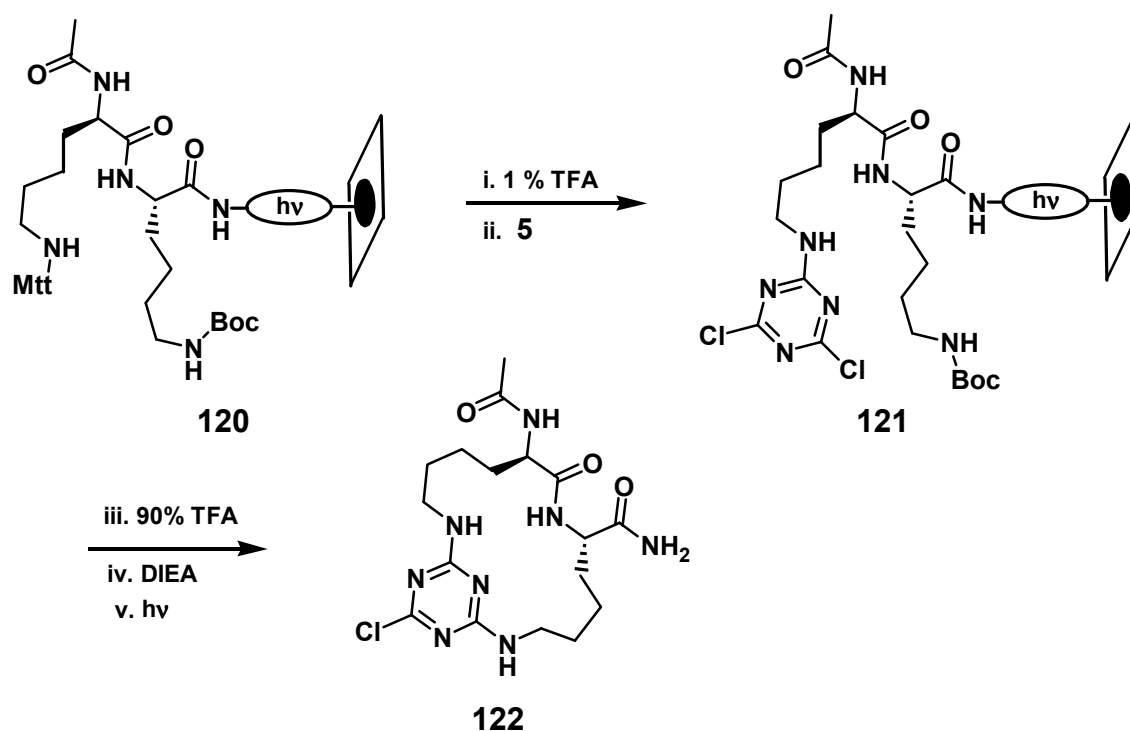
Die Ergebnisse dieser Untersuchungsreihe bzgl. der Reinheit der Cyclisierungsausbeute der Zielverbindungen sind noch besser als für die Sequenzen des Typs Ala-Xxx-Lys. Es scheint, dass der Einfluss der *N*-terminalen Aminosäure auf die Cyclisierungseffizienz sehr gering ist. Im Fall des *N*-terminalen Glycins verlief die Synthese des Ausgangspeptides mit geringeren Reinheiten, es konnten nach der Cyclisierung keine linearen Peptid-Triazinderivate nachgewiesen werden. Erneut verlief die Synthese des Histidin-haltigen Peptides mit geringer Reinheit. Die Cyclisierung „vorbei“ an den weiteren Tritylgeschützten Aminosäuren gelang in sehr guten Reinheiten.

Die Untersuchungen zur Kompatibilität der verschiedenen Seitenketten der proteinogenen Aminosäuren bzw. mit den entsprechenden Schutzgruppen mit der neuen Cyclisierungsmethode ergaben, dass fast alle Aminosäuren ohne Probleme eingesetzt werden können. Eine Ausnahme bildet hierbei eventuell Histidin, da es in beiden Untersuchungen die Produkte mit der geringsten Reinheit lieferte. Die restlichen 18 untersuchten Aminosäuren führen in beiden Modellsystemen zu keinerlei Nebenreaktionen. Diese proteinogenen Aminosäuren konnten erfolgreich *N*-terminal (im Modell Xxx-Phe-Lys) und direkt vor dem Cyclisierungsanker Lysin (Ala-Xxx-Lys) eingesetzt werden. Die Verwendung vom Mtt als Schutzgruppe für die ϵ -Aminofunktion des Lysins ermöglicht durch ihre selektive Abspaltbarkeit den Einsatz weiterer Lysine in der zu cyclisierenden Sequenz, ohne dass Regioisomere bzgl. des Ringschlusses auftreten.

3.3 Variation der Cyclisierungsrichtung

Neben der bislang verwendeten Cyclisierung von Peptiden vom *N*-Terminus auf die ϵ -Aminogruppe der Lysin-Seitenkette sollten weitere Richtungen der Cyclisierung untersucht werden. Eine zusätzliche Möglichkeit eine konformelle Restriktion in Peptide einzuführen liegt in der Cyclisierung ausgehend von der Seitenkette hin zu dem *N*-Terminus. Aufgrund der Symmetrie des [1,3,5]-Triazinringes entstehen hierbei allerdings die selben Cyclen wie bei dem Ringschluss durch nucleophilen Angriff der Seitenketten-Aminogruppe an das *N*-terminal gebundene Dichlor-[1,3,5]-triazin.

Bei der Verknüpfung zweier Seitenkette-Aminogruppen eines Peptides hingegen werden zusätzliche Cyclen erhalten. Im Folgenden wurde diese „Seitenkette-zu-Seitenkette“-Cyclisierung untersucht. Das einfachste Modellpeptid für diese Untersuchungen ist das *N*-terminal acetylierte Dipeptid Lys-Lys. Der [1,3,5]-Triazinring wurde hierbei nicht wie zuvor am *N*-Terminus, sondern an einer Lysin-Seitenkette immobilisiert. Die intramolekulare nucleophile Substitution am Dichlor-[1,3,5]-triazin sollte dann durch eine ϵ -Aminogruppe eines weiteren Lysins erfolgen. Entscheidend für die Synthese ist, wie schon bei der Untersuchung zur Kompatibilität der proteinogenen Aminosäuren (Kapitel 3.2), die selektive Entfernung der Mtt-Gruppe von der Seitenketten eines entsprechend geschützten Lysins in Gegenwart eines zweiten, an der ϵ -Aminoseitenkette Boc-geschützten Lysins (Schema 33).



Schema 33: „Seitenkette-zu-Seitenkette“-Cyclisierung durch intramolekulare Chlorsubstitution am Dichlor-[1,3,5]-triazin.

Die Synthese des Dipeptides **120** erfolgte am Photolinker einer aminoderivatisierten Zellulosemembran. Nach Acetylierung des *N*-Terminus wurde selektiv die Mtt-Schutzgruppe an der Seitenkette des *N*-terminalen Lysins entfernt und der [1,3,5]-

Triazinring immobilisiert. Nach Entschützung der ε -Aminogruppe des C-terminalen Lysins gelang eine intramolekulare Substitution eines Chloratoms am Dichlor-[1,3,5]-triazin durch Einsatz einer 10 %-igen DIEA-Lösung in NMP (v/v) innerhalb von 30 min. Diese „Seitenkette-zu-Seitenkette“-Cyclisierung wurde an zwei weiteren Modellpeptiden erfolgreich untersucht (Tabelle 27).

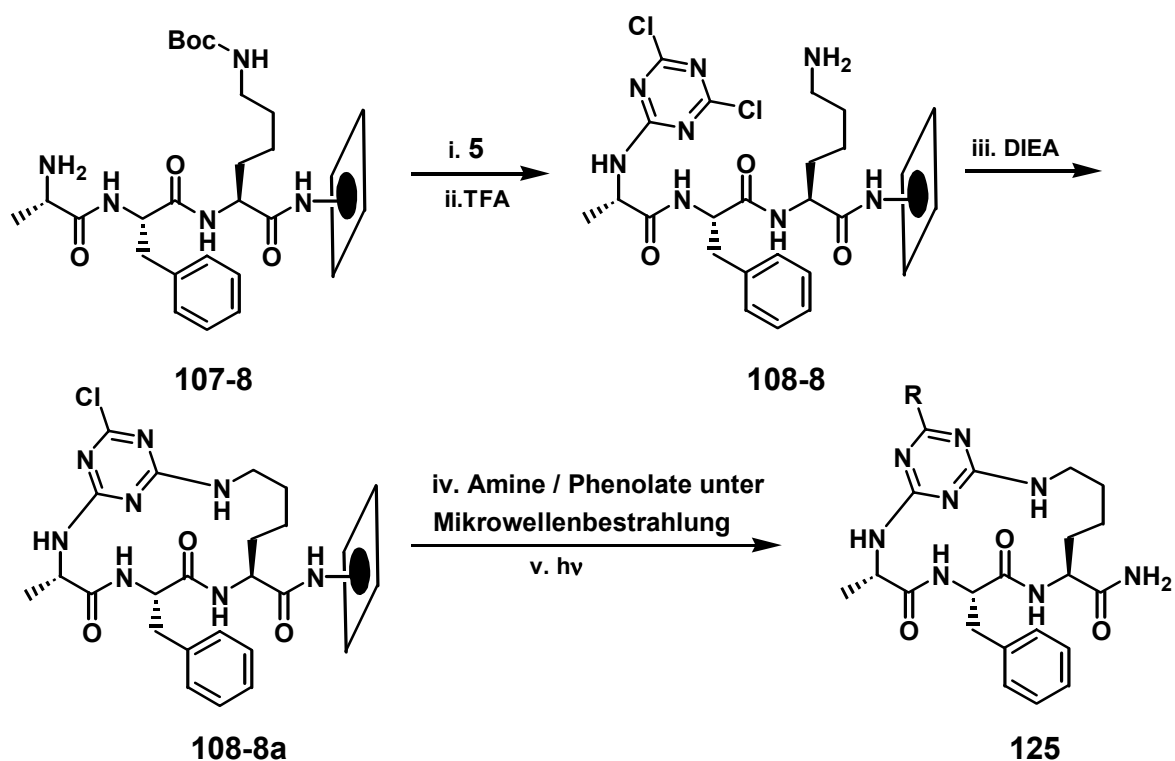
Tabelle 27: „Seitenkette-zu-Seitenkette“ Cyclisierung durch intramolekulare Substitution eines Chloratoms am Dichlor-[1,3,5]-triazinrest mit der ε -Aminogruppe eines C-terminalen Lysins.

Nr.	Sequenz	Cyclisierung [%]	Reinheit [%]
122	Ac-Lys-Lys	97	76
123	Ac-Lys-Phe-Lys	98	78
124	Ac-Lys-Ala-Phe-Lys	97	78

Die geringeren Reinheiten nach Abspaltung der cyclischen Peptidmimetika von der Zellulosemembran sind auf eine unvollständige Kopplung des N-terminalen Lysins zurückzuführen. In allen drei Fällen konnte eine geringe Menge an hydrolysiertem linearen Peptid-Triazinderivat (ca. 2 %) nachgewiesen werden. Dennoch gelang der Ringschluss bei allen untersuchten Modellpeptiden nahezu vollständig. Neben der Cyclisierung durch nucleophilen Angriff einer Aminoseitenkette am N-terminalen Dichlor-[1,3,5]-triazin ist die neue Methode somit auch auf den Ringschluss „Seitenkette-zu-Seitenkette“ übertragbar.

3.4 Nucleophile Substitution an cyclischen 6-Monochlor-[1,3,5]-triazinderivaten

Nach erfolgter Monochlorsubstitution am Dichlor-[1,3,5]-triazin durch eine Aminosäureseitenkette verbleibt noch ein weiteres Chloratom am [1,3,5]-Triazinring. Dies bietet die Möglichkeit die molekularen Eigenschaften der cyclischen Peptidmimetika zu variieren. Im Kapitel 2.5 wurden Bedingungen zur Chlorsubstitution unter Mikrowellenbestrahlung an „linearen“ Triazine beschrieben, welche auf die hier erhaltenden cyclischen Verbindungen angewendet werden sollten.

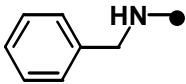
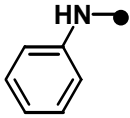
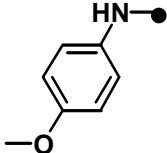
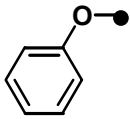
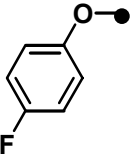


Schema 34: Einsatz von Mikrowellenbestrahlung zur Chlorsubstitution an cyclischen Peptid-Triazinderivaten.

Tabelle 28: Untersuchungen zur Chlorsubstitution unter Mikrowellenbestrahlung an cyclischen Peptid-Triazinderivaten.

Nr.	 R-●	Reinheit nach Cyclisierung und nucleophiler Substitution unter Mikrowellenbestrahlung [%]
125-1		78
125-2		90
125-3		87
125-4		86
125-5		90

Fortsetzung Tabelle 28

Nr.	R●	Reinheit nach Cyclisierung und nucleophiler Substitution unter Mikrowellenbestrahlung
		[%]
125-6		81
125-7		88
125-8		89
125-9		83
125-10		86

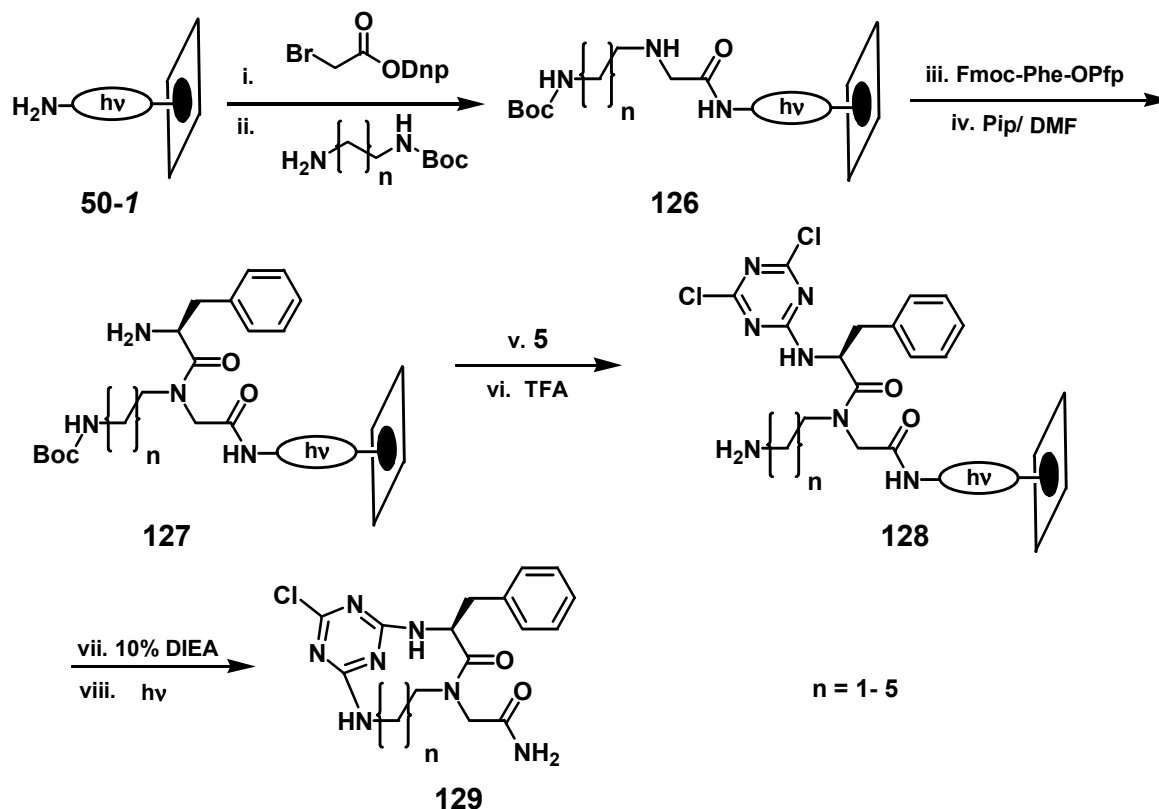
Wie bereits bei den Untersuchungen an den „linearen“ Triazinderivaten erwies sich die Mikrowellenbestrahlung als geeignete Methode für den Energietransfer bei der Chlorsubstitution. In allen Fällen erfolgte die Reaktion der Nucleophile mit dem Monochlor-[1,3,5]-triazinrest in sehr guten Umsätzen. Die Schwankungen in den Reinheiten der Zielpunkte resultieren vornehmlich aus der Peptidsynthese. So wurde gefunden, dass speziell im Fall von *n*-Butyl- und Benzylamin (**125-1** und **125-6**) die Kopplung des Alanins unvollständig war. Insgesamt konnte anhand dieser zehn Beispiele gezeigt werden, dass das verbliebene Chloratom der cyclischen Peptid-Triazinderivate mit einer Reihe von Aminen und Phenolaten umgesetzt werden kann, um so die Diversität der Verbindungen zu erhöhen, und ggf. die molekularen Eigenschaften hinsichtlich pharmakologischer Fragestellungen zu variieren.

3.5 Weitere lineare Oligomere mit orthogonal geschützten Aminogruppen

Bei der Untersuchung der intermolekularen Monochlorsubstitution membrangebundener Dichlor-[1,3,5]-triazine (Kapitel 2.6) konnte gezeigt werden, dass die Reaktion des [1,3,5]-Triazingerüst mit den eingesetzten Aminen unabhängig von der Art des Ankers (Peptid, Aminosäure, Peptomer usw.) ist. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob auch bei der intramolekularen Chlorsubstitution am Dichlor-[1,3,5]-triazin verschiedene lineare Oligomere eingesetzt werden können.

3.5.1 Peptomere als lineare Sequenzen für die Cyclisierung

Es wurde eine Reihe verschiedener Peptomere untersucht, die nach der Cyclisierung verschiedene Ringgrößen ergeben. Unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse der Synthese grosser Ringe beschränkten sich die Untersuchungen zur Cyclisierung von Peptomeren auf die Darstellung kleiner 10 bis 17-gliedriger Ringe. Wie zuvor bei der Untersuchung zur minimal erreichbaren Ringgrösse bei der Cyclisierung von Peptiden (Kapitel 3.1.3) wurden in der Synthese der Peptoideinheit nach der Sub-Monomer-Methode Mono-Boc-geschützte Diamine mit unterschiedlicher Länge der Alkylkette eingesetzt (Schema 35).

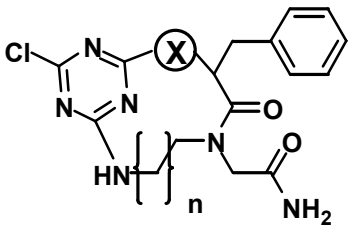


Schema 35: Darstellung von Peptomer-Triazin-Cyclen mit verschiedenen Ringgrößen durch Variation der Aminoseitenkettenlängen.

Die Synthese der linearen Peptomere mit anschliessender Immobilisierung von Cyanurchlorid, Entschützung der Aminogruppe der Seitenketten und Cyclisierung durch intramolekulare Reaktion der Aminogruppe mit dem Dichlor-[1,3,5]-triazinrest wurde sowohl an der Zellulose- als auch an der PP-Membran durchgeführt.

Zusätzlich zu den Peptomeren die in Schema 35 dargestellt sind, wurden die trimeren Peptomere mit zusätzlichem Alanin am N-Terminus in die Untersuchungen mit einbezogen. Die Reinheiten nach erfolgter Cyclisierung und Abspaltung sind in Tabelle 29 zusammengefasst.

Tabelle 29: Variation der Ringgrösse durch Einsatz verschiedener Diamine im Peptoid-Baustein und Sequenzlänge.

Nr.	Cyclus	Ringgrösse [Anzahl der Ringatome]	Reinheit nach Cyclisierung an der	
			Zellulose [%]	PP-Membran [%]
				
129-1	X = NH, n = 5	14	60	65
129-2	X = NH, n = 4	13	70	75
129-3	X = NH, n = 3	12	79	75
129-4	X = NH, n = 2	11	35 + 40 ^b	20 + 10 ^b
129-5	X = NH, n = 1	10	n.n. ^a (30 ^b)	n.n. ^a (25 ^b)
130-1	X = NHCH(CH ₃)CONH, n = 5	17	80	65
130-2	X = NHCH(CH ₃)CONH, n = 4	16	89	85
130-3	X = NHCH(CH ₃)CONH, n = 3	15	73	90
130-4	X = NHCH(CH ₃)CONH, n = 2	14	75	95
130-5	X = NHCH(CH ₃)CONH, n = 1	13	58	90

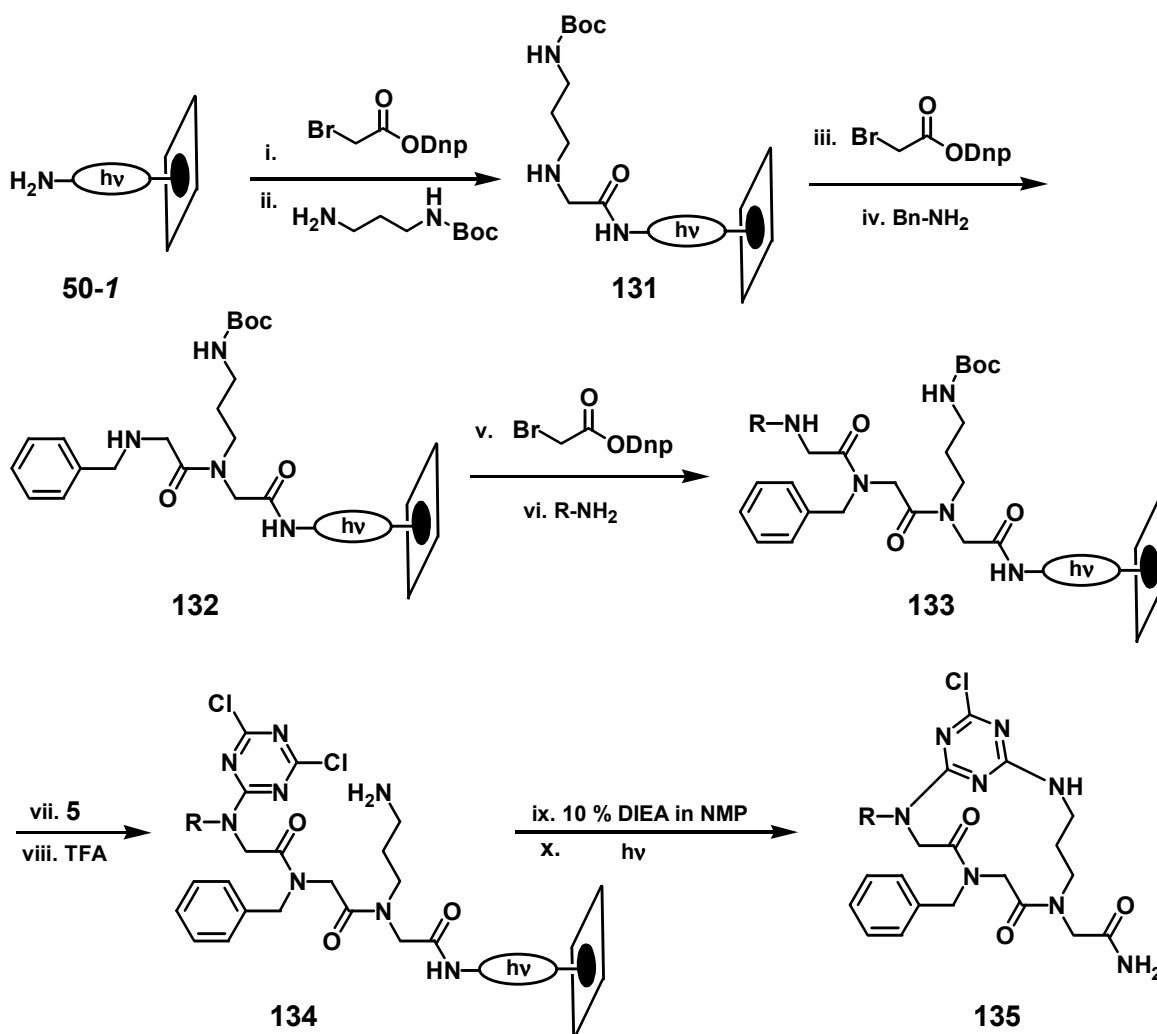
^a n.n. nicht nachweisbar^b Anteil an gefundenem Dimer

An diesem Modell konnten die bisherigen Ergebnisse, die erreichbaren Ringgrössen betreffend, bestätigt werden. An beiden Membranen konnten 12-gliedrige Ringe (**129-3**) mit guter Cyclisierungsausbeute und Reinheit dargestellt werden. Die Reinheit der 11-gliedrigen Ringe (**129-4**) lag unter der bei der Cyclisierung von Peptiden (Tabelle 26, **112-3**) beobachteten. In den Fällen unvollständiger oder nicht erfolgter intramolekularer nucleophiler Substitution konnte zusätzlich ein Anteil an Dimer aus zwei Peptomer-Triazineinheiten (**129-4** und **129-5**) mittels HPLC-MS nachgewiesen werden, welches durch die intermolekulare Reaktion des Dichlor-[1,3,5]-triazinreste mit den Aminogruppen des Peptoidbausteins generiert wurde. Aufgrund der weiteren Ergebnisse dieser Versuchsreihe, ist es wahrscheinlich, dass das Dimer in Lösung erst nach der Abspaltung gebildet wurde, da bei längeren und somit flexibleren Alkylketten (**129-1** bis **129-3** und **130-1** bis **130-3**) kein Dimer nachgewiesen werden konnte.

Eine Untersuchung des Einflusses eines *N*-terminalem Peptoid-Baustein erfolgte im Rahmen der Cyclisierung von „reinen“ Peptoiden, wie im folgenden Kapitel beschrieben.

3.5.2 Peptide als lineare Sequenzen für die Cyclisierung

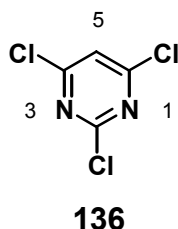
Die dritte Gruppe an untersuchten linearen Oligomeren zur Cyclisierung durch Cyanurchlorid stellten die Peptide dar. Die Synthese erfolgte nach der Sub-Monomer-Methode sowohl an einer aminoderivatisierten Zellulose- als auch an einer PP-Membran. Wie in den vorangegangenen Untersuchungen wurde der Photolinker eingesetzt (Schema 36).



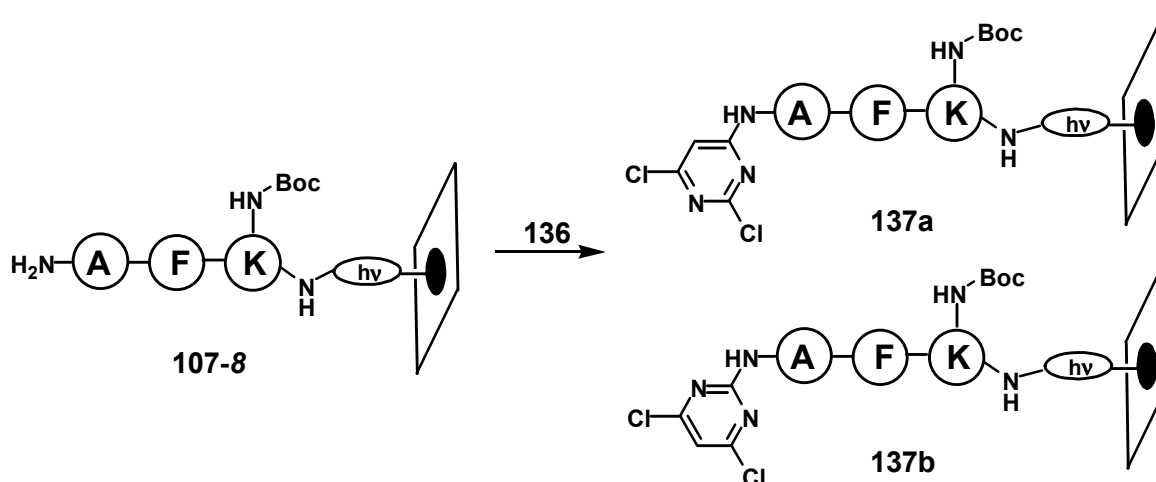
Schema 36: Cyclisierung von Peptoiden durch intramolekulare Reaktion einer Aminosidekettengruppe mit einem am N-Terminus befindlichem Dichlor-[1,3,5]-triazinrest.

Es wurden *N*-terminal fünf verschiedene Amine (*n*-Butylamin, Benzylamin, Mono-Boc-1,5-Diaminopentan, 4-Amino-1-butanol und *p*-Anisidin) zur Bromsubstitution für die Synthese der Tripeptide eingesetzt. Nach Darstellung der Peptide wurde der Triazinring durch Inkubation der Zellulose- und der PP-Membran mit einer 2 M Lösung von Cyanurchlorid in DCM immobilisiert. Anschliessend wurde die Boc-Schutzgruppe der Seitenkette entfernt und die Cyclisierung durch Inkubation der Membranen in einer 10 %-igen DIEA Lösung in NMP durchgeführt. Aus Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen (Kapitel 3.5.1) war eine Nebenreaktion der ϵ -Aminogruppe des eingesetzten 1,5-Diaminopentans nicht zu erwarten. Die Reinheiten nach erfolgter Cyclisierung und Abspaltung vom planaren Träger sind in Tabelle 30 zusammengefasst.

3.6.1 2,4,6-Trichlorpyrimidin



Die Untersuchungen zum Einsatz weiterer halogener Heteroaromaten wurden mit 2,4,6-Trichlorpyrimidin begonnen. Zunächst wurden die Bedingungen zur Immobilisierung des Aromaten an dem membrangebundenen Tripeptid erarbeitet. Bei der Immobilisierung können zwei Regioisomere bzgl. der Substitution der Chloratome am Pyrimidinring auftreten (Schema 37).



Schema 37: Regioisomere Dichlorpyrimidin-Peptid nach Reaktion von 2,4,6-Trichlorpyrimidin **136** mit Ala-Phe-Lys an der Zellulosemembran.

Untersuchungen der Reaktivität der Chloratome in 2- und 4-Position am Pyrimidinring gegenüber Aminen von Delia *et. al.* zeigten eine statistische Verteilung der Produkte von eins zu zwei zugunsten der 4-Aminoderivate.^[133]

Zur Bestimmung der Immobilisierungsausbeute von 2,4,6-Trichlorpyrimidin am N-Terminus des zellulosegebundenen Tripeptides wurde keine Referenzverbindung am Harz synthetisiert, sondern das Verhältnis in der HPLC-Spur nach Abspaltung vom Träger von Dichlorpyrimidin-Peptid **138** und „freiem“ Ala-Phe-Lys ohne Dichlorpyrimidinrest bestimmt. Hierbei wurde nur die Summe beider Regioisomere am Dichlorpyrimidin-Peptid **138a** und **b** berücksichtigt. Eine Änderung des Verhältnisses der Regioisomere zueinander bei den einzelnen Immobilisierungsversuchen wurde nicht beobachtet. Die Versuche zur Immobilisierung von 2,4,6-Trichlorpyrimidin **136** erfolgten durch Inkubation der gesamten Membran mit einer 50 %-igen Lösung von **136** in NMP. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche sind in Tabelle 31 dargestellt.

Tabelle 31: Bedingungen zur Immobilisierung von **136** an zellulosegebundenem **107-8** und Verhältnis von Zielverbindung/Tripeptid nach der Abspaltung.

Nr.	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Base	Verhältnis ^a 138 / Tripeptid
1	30	RT	-	8 / 92
2	30	RT	10 % DIEA	32 / 68
3	30	50	-	19 / 81
4	30	80	10 % DIEA	72 / 28
5	60	RT	10 % DIEA	40 / 60
6	60	50	-	31 / 69
7	60	50	10 % DIEA	74 / 26
8	60	80	10 % DIEA	81 / 19
9	120	50	10 % DIEA	90 / 10
10	120	80	10 % DIEA	98 / 2

^a aus der Summe beider regioisomeren Dichlorpyrimidin-Peptide **137a** und **b**

Für die Versuche bei erhöhter Temperatur (Nr. 3,4 und 6-10) wurde die Membran in einer Metallschale auf einer beheizbaren Matte platziert, wobei die angegebene Temperatur auf der Oberfläche der Matte gemessen wurde. Die besten Ergebnisse zur Immobilisierung wurden mit einer zweistündigen Inkubation der Membran in Gegenwart von 10 % DIEA bei 80°C erzielt (Nr. 10). Nach Abspaltung von der Zellulose wurden zwei regioisomere Dichlorpyrimidin-Peptid-Addukte erhalten. Die Bestimmung des Verhältnisses der beiden Verbindungen und deren massenspektroskopische Analyse erfolgte durch HPLC-MS (Abb. 17). Die Zuordnung der Regioisomere erfolgte unter der Annahme gleicher Absorptionskoeffizienten, in Anlehnung an die Ergebnisse bzgl. der Regiochemie von Dolle *et. al.*^[70]

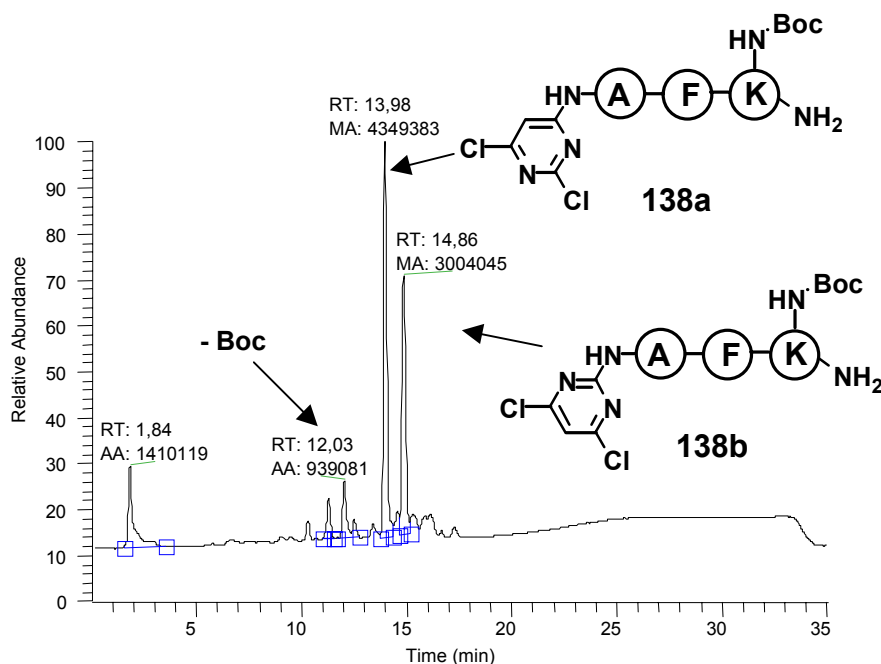
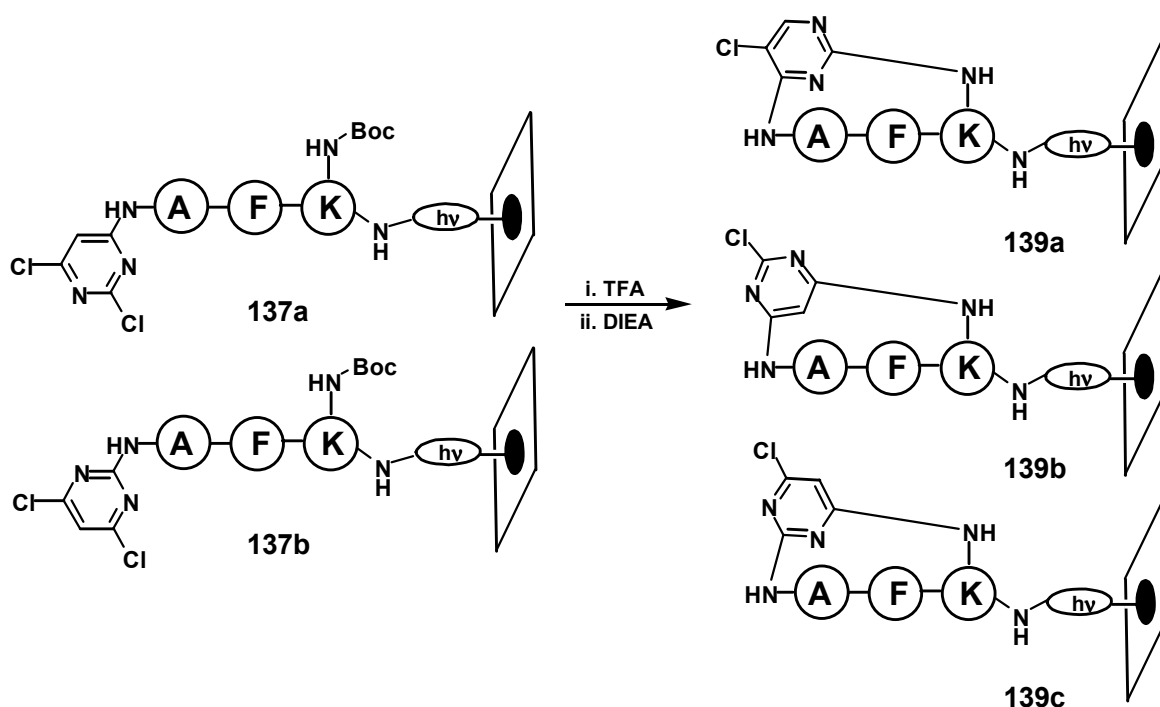


Abb. 17: HPLC-Spur der regioisomeren Dichlorpyrimidin-Peptide; im Verlauf der Analytik kam es zu partiellen Boc-Entschützung durch TFA im Lösungsmittel.

Zur genauen Identifizierung der Regioisomere wurde die Synthese am Rink-Linker eines Syntheseharzes wiederholt, um so ausreichend Substanz für eine NMR-Analytik zu erhalten. Nach Immobilisierung von 2,4,6-Trichlorpyrimidin am *N*-Terminus des Tripeptides Ala-Phe-Lys wurden die Verbindungen mit TFA abgespalten. Die beiden erhaltenden Regioisomere wurden HPLC-chromatographisch getrennt und mittels NMR untersucht. Zur Bestimmung der Regiochemie wurde die unterschiedliche Verschiebung des C-5 Atoms im Dichlorpyrimidinring in Abhängigkeit der Substitution in Nachbarstellung ausgenutzt. Befindet sich das C-5-Atom zwischen zwei chloresubstituierten Kohlenstoffatomen, so ist das entsprechende Signal im ^{13}C -NMR-Spektrum zu tieferem Feld verschoben, als wenn sich in Nachbarschaft ein NH-Substituent befindet. Die Zuordnung der Regioisomere aus Abb. 17 konnte anhand der Retentionszeiten und der NMR-Spektren der jeweiligen Verbindung bestätigt werden.

Im Anschluss an die Immobilisierung von 2,4,6-Trichlorpyrimidin am zellulosegebundenem Tripeptid Ala-Phe-Lys erfolgten die Untersuchungen zur intramolekularen Substitution am Dichlorpyrimidinrest. Hierzu wurde die Boc-Schutzgruppe der ϵ -Aminogruppe des C-terminalen Lysins durch Inkubation der Membran in einer 80 %-igen TFA-Lösung in DCM entfernt. Die Membran wurde mit 1 M HCl behandelt, um eventuell entstandene Trifluoracetylierungsprodukte zu zersetzen. Die Darstellung der regioisomeren cyclischen Produkte nach Entfernen der HCl und Zusatz von Base sollte die Cyclisierung an der Zellulose erreicht werden (Schema 38).



Schema 38: Intramolekulare Substitution am Dichlorpyrimidinrest von **137** durch die ϵ -Aminogruppe des Lysins der Tripeptid-Einheit an der Zellulosemembran.

Es sollten Bedingungen gefunden werden, unter denen eine Cyclisierung möglichst quantitativ erfolgt. Dabei musste die Möglichkeit einer Hydrolyse des Dichlorpyrimidinrestes durch die Gegenwart der Base und Spuren von Wasser bei der Reaktion berücksichtigt werden. Die untersuchten Bedingungen sind in Tabelle 32 zusammengefasst.

Tabelle 32: Bedingungen für die intramolekulare Substitution am Dichlorpyrimidinrest durch die ϵ -Aminogruppe der Tripeptid-Einheit.

Nr.	Zeit	Temperatur	Cyclisierung	Reinheit
	[h]	[°C]	[%]	[%]
1	4	RT	10	10
2	8	RT	15	15
3	4	50	25	23
4	8	50	35	30 ^a
5	2	80	68	61 ^a
6	8	80	79	60 ^a
7	3 min	> 100°C ^b	85	79
8	2 x 3 min	> 100°C ^b	99	92

^a teilweise Hydrolyse

^b unter Mikrowellenbestrahlung

Bei langen Reaktionszeiten und erhöhter Temperatur (Nr. 4-6) kam es zum Teil zu einer Hydrolyse des Dichlorpyrimidinrestes, was durch HPLC-MS Analytik nachgewiesen werden konnte. Die besten Ergebnisse konnten durch den Einsatz von Mikrowellenbestrahlung erhalten werden (Nr. 7-8). Nach zweimaliger Bestrahlung à drei Minuten konnte das lineare Edukt nur noch in der Massenspur des HPLC-MS-Laufes nachgewiesen werden (zur Empfindlichkeit der Massendetektion vgl. Kapitel 2.3).

Es gelang nicht, die HPLC-Peaks der regioisomeren cyclischen Produkte zu trennen, um zu überprüfen, ob alle drei theoretisch möglichen Produkte entstanden waren (Abb. 18).

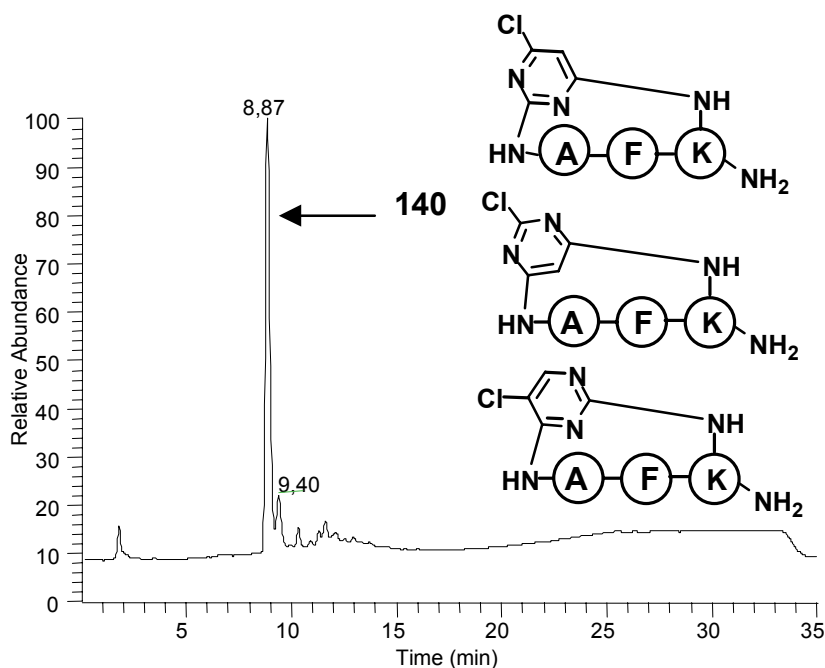
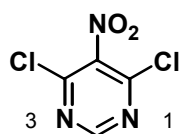


Abb. 18: HPLC-Spur der drei möglichen regioisomeren cyclischen Monochlorpyrimidin-Peptide **140** direkt nach der Abspaltung von der Zellulose.

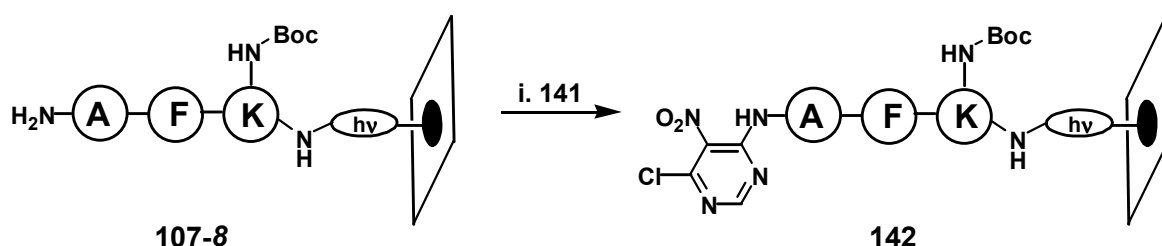
Anhand der guten Ausbeuten der Cyclisierung scheinen die Chlorsubstitutionen an den einzelnen Positionen des Pyrimidinringes durch die ϵ -Aminogruppe des Lysins vollständig zu verlaufen. Wie bereits bei der Analytik der [1,3,5]-Triazin-Bibliothek mit Peptomerteil (vgl. Kapitel 2.6) kam es zur partiellen Hydrolyse am C-Terminus. So handelte es sich bei der Verbindung mit einer Retentionszeit von 9,40 min in Abb. 18 nicht um ein Regioisomer, sondern es wurde eine um eine grössere Molmasse als bei **140** beobachtet, was auf eine (die) C-terminale Säure(n) hindeutet.

Es gelang nicht nur 2,4,6-Trichlorpyrimidin an dem N-Terminus eines zellulose-gebundenem Peptides zu immobilisieren, sondern es konnten auch Bedingungen gefunden werden, unter denen ein verbliebenes Chloratom am Pyrimidinring durch eine weitere Aminogruppe des Peptides substituiert werden kann. Dies ist somit der erste Hinweis auf die Übertragbarkeit des Konzeptes der Cyclisierung von linearen Oligomeren durch schrittweise nucleophile Substitution am Cyanurchlorid **5** auf weitere halogenierte Heteroaromaten. Im Folgenden wurden zwei weitere Stickstoff-Heteroaromaten untersucht.

3.6.2 4,6-Dichlor-5-nitropyrimidin

**141**

Der nächste untersuchte halogenierte Heteroaromat war das 4,6-Dichlor-5-nitropyrimidin **141**. Aufgrund der Symmetrie der beiden Positionen der Chloratome am Pyrimidinring können bei der Immobilisierung dieses Pyrimidinderivates keine Regioisomere auftreten (Schema 39).



Schema 39: Immobilisierung von 4,6-Dichlor-5-nitropyrimidin **141** an zellulosegebundenen Ala-Phe-Lys.

Die Vorgehensweise bei den Versuchen zur Immobilisierung am *N*-Terminus des zellulosegebundenem Tripeptides Ala-Phe-Lys war analog zu der bei 2,4,6-Trichlorpyrimidin. Die Tripeptid-modifizierte Zellulose wurde mit einer 1 M Lösung von 4,6-Dichlor-5-nitropyrimidin in NMP unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Das Verhältnis aus 6-Chlor-5-nitropyrimidin-Peptid **143** zu „freiem“ Peptid wurde nach der Abspaltung durch HPLC-MS-Analytik bestimmt, um so die jeweiligen Umsetzungen zu ermitteln. Die Ergebnisse der verschiedenen Bedingungen sind in Tabelle 33 zusammengefasst.

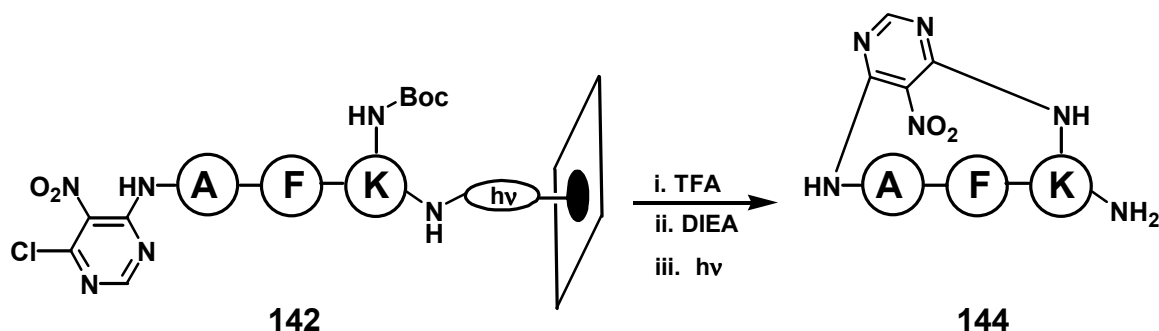
Tabelle 33: Bedingungen zur Immobilisierung von 4,6-Dichlor-5-nitropyrimidin an den *N*-Terminus von zellulosegebundenem Ala-Phe-Lys.

Nr.	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Base	Verhältnis 6-Chlor-5-nitropyrimidin-Peptid / Peptid
1	30	RT	-	40 / 60
2	30	RT	10 % DIEA	66 ^a / 34
3	30	50	-	44 / 56
4	60	RT	10 % DIEA	94 ^a / 6
5	60	RT	5 % DIEA	94 ^a / 6
6	60	RT	1 % DIEA	98 / 2

^a inklusive Hydrolyseprodukt

Hierbei stellte sich heraus, dass das verbliebene Chloratom des 6-Chlor-5-nitropyrimidin-peptids scheinbar in Gegenwart von Base besonders leicht hydrolysiert (Nr. 2, 4 und 5). Die HPLC-MS Analytik zur Hydrolyse eines Chloratoms in Lösung ergab, dass eine 1 M Lösung von 4,6-Dichlor-5-Nitro-pyrimidin in NMP in Gegenwart von 10 % DIEA mindest. zwei Stunden stabil ist. Die Hydrolyse an der Zelluloseoberfläche kann jedoch durch Einsatz nur einer sehr geringen Mengen an Base (Nr. 6) vermieden werden. In diesem Fall lässt sich das gewünschte Produkt in sehr guter Reinheit (> 95 %) erhalten.

Der nächste Schritt im Rahmen dieser Untersuchungen war, nach Entschützung der ϵ -Aminogruppe des Lysins, das Auffinden geeigneter Bedingungen zur nucleophilen Substitution des verbliebenden Chloratoms am Pyrimidinring (Schema 40).



Schema 40: Intramolekulare Substitution am 6-Chlor-5-nitropyrimidinrest durch die ϵ -Aminogruppe des Lysins der Tripeptid-Einheit an der Zellulosemembran.

Hierbei musste besonders auf die leichte Hydrolysierbarkeit des Chloridrestes, als Nebenreaktion der Cyclisierung, geachtet werden. Für die Cyclisierungsversuche wurden eine Reihe verschiedener Basen eingesetzt, um bei maximaler Cyclisierungseffizienz möglichst keine Hydrolyse zu erhalten. Nach Abspaltung von der Membran wurde das erhaltende Gemisch mittels HPLC-MS analysiert und das Verhältnis von Cyclus **144**, freiem Peptid und Hydrolyseprodukt bestimmt (Tabelle 34).

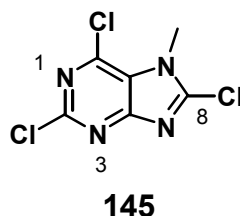
Tabelle 34: Bedingungen für die intramolekulare Substitution am 6-Chlor-5-nitropyrimidinrest durch die ϵ -Aminogruppe des Lysins der Tripeptid-Einheit.

Nr.	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Base	Cyclisierung [%]	Lineares Edukt / Hydrolyse [%]
1	30	RT	1 % DIEA	60	30 / 10
2	30	RT	1 % DABCO	15	70 / 15
3	30	RT	5 % DABCO	25	62 / 23
4	30	RT	1 % DBU	24	56 / 30
5	30	50	1 % DIEA	68	22 / 10
6	60	RT	1 % DIEA	97	2 / 1

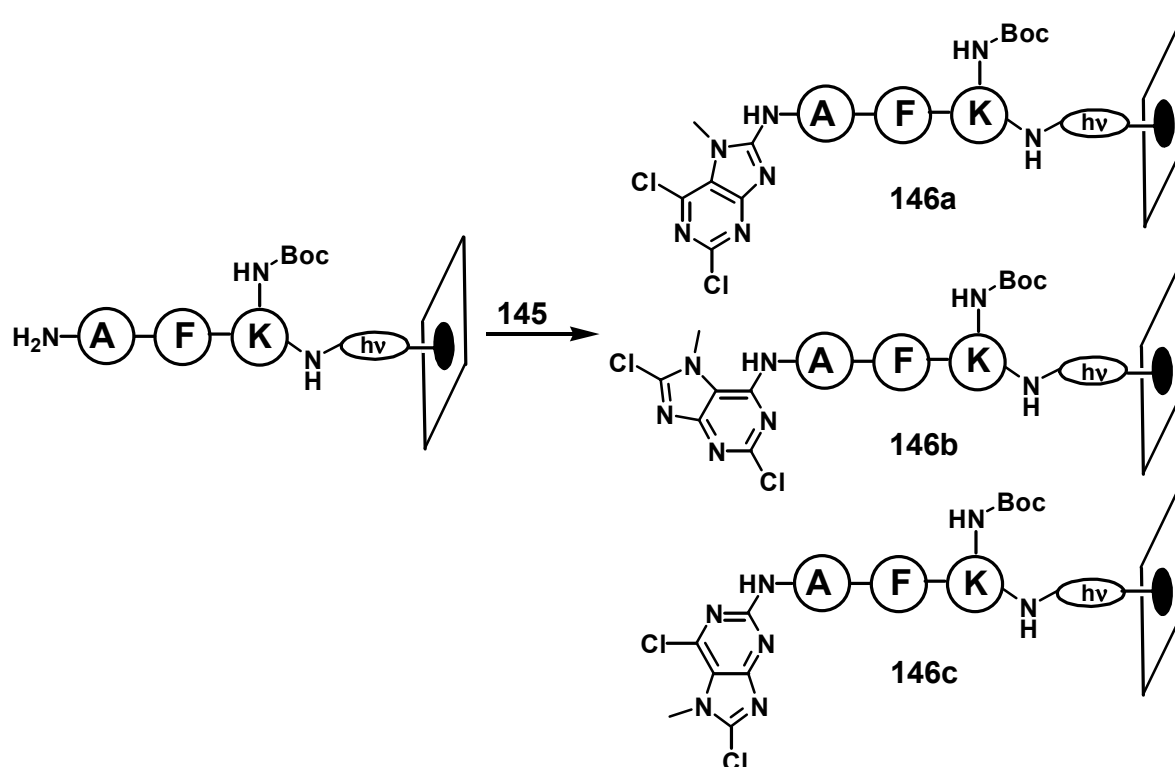
Der Einsatz von DABCO oder DBU als Basen bei der Cyclisierung (Nr. 2 bis 4) führte zu einem grossen Anteil an hydrolisiertem Produkt. Eine Erhöhung der Temperatur erwies sich als ungeeignet verglichen mit einer Verlängerung der Reaktionszeit (Nr. 5 und 6). Eine einstündige Behandlung des zellulosegebundenem 6-Chlor-5-nitropyrimidin-Peptidderivates mit einer 1 %-igen DIEA in NMP Lösung (v/v) lieferte die besten Ergebnisse.

Es konnten Bedingungen zur Immobilisierung an einem *N*-Terminus eines zellulosegebundenem Tripeptides für 2,6-Dichlor-5-nitropyrimidin gefunden werden. Desweiteren gelang eine Cyclisierung von Peptiden an Zellulose mittels nucleophiler Substitution des verbleibenden Chloratoms durch eine zuvor geschützte Aminogruppe. Es handelt sich damit um einen weiteren, für diesen Zweck erfolgreich eingesetzten halogenierten Stickstoff-Heteroaromat und liefert einen Hinweis auf die allgemeine Anwendbarkeit der neuen Cyclisierungsmethode.

3.6.3 2,6,8-Trichloro-7-methyl-7*H*-purin



Nach einem halogenierten Triazin und zwei Pyrimidinderivaten wurde als Vertreter einer dritten Gruppe an Heteroaromaten das 2,6,8-Trichloro-7-methyl-7*H*-purin untersucht. Das Vorgehen hierbei erfolgte in Analogie zu den in Kapitel 3.6.1 und 3.6.2 beschriebenen Cyclisierungsversuchen. Wie bereits beim 2,4,6-Trichlorpyrimidin kann es bei der Immobilisierung von 2,6,8-Trichloro-7-methyl-7*H*-purin zu Regioisomeren kommen. In diesem Fall sind drei Regioisomere möglich (Schema 41).



Schema 41: Immobilisierung von 2,6,8-Trichloro-7-methyl-7H-purin **145** an den N-Terminus des zellulosegebundenen Tripeptides Ala-Phe-Lys unter Ausbildung dreier möglicher Regioisomere.

Die unterschiedliche Reaktivität der einzelnen Chloratome des 2,6,8-Trichloro-7-methyl-7H-purin gegenüber Nucleophilen wurde von Sutcliffe *et. al.* untersucht.^[134] Er fand heraus, dass die Reaktivität der Positionen am **145** in der Reihenfolge 8 > 6 > 2 abnahm. Im Fall der Immobilisierung wäre somit eine Produktverteilung von a > b > c zu erwarten. In Tabelle 35 sind die Bedingungen zur Immobilisierung und die jeweiligen Ergebnisse gegenüber gestellt.

Tabelle 35: Bedingungen zur Immobilisierung von 2,6,8-Trichloro-7-methyl-7H-purin an den N-Terminus von zellulosegebundenem Ala-Phe-Lys.

Nr.	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Base	Verhältnis ^a Dichlorpurin-Peptid/Peptid
1	30	RT	-	12 / 88
2	30	RT	10 % DIEA	28 / 72
3	30	50	10 % DIEA	38 / 62
4	30	80	10 % DIEA	74 / 26
5	60	50	10 % DIEA	78 / 22
6	60	80	10 % DIEA	87 / 13
7	120	50	10 % DIEA	91 / 9
8	120	80	10 % DIEA	93 / 7

^a aus der Summe aller regioisomeren Dichlorpurin-Peptide **147a-c**

Nach Abspaltung von der Zellulosemembran wurden die Gemische mittels HPLC-MS analysiert. Hierbei zeigte sich, dass bei allen acht untersuchten Bedingungen mehr als ein Peak erhalten wurde, der die erwartete Masse für die abgespaltenen Dichlorpurin-Peptid-derivate **147a-c** aufwies. Exemplarisch ist das HPLC-Chromatogramm des Rohprodukts von Nr. 8 aus der Tabelle 35 gezeigt, wobei die Peaks gekennzeichnet sind, deren korrespondierende Verbindung die entsprechende Masse zeigte (Abb. 19).

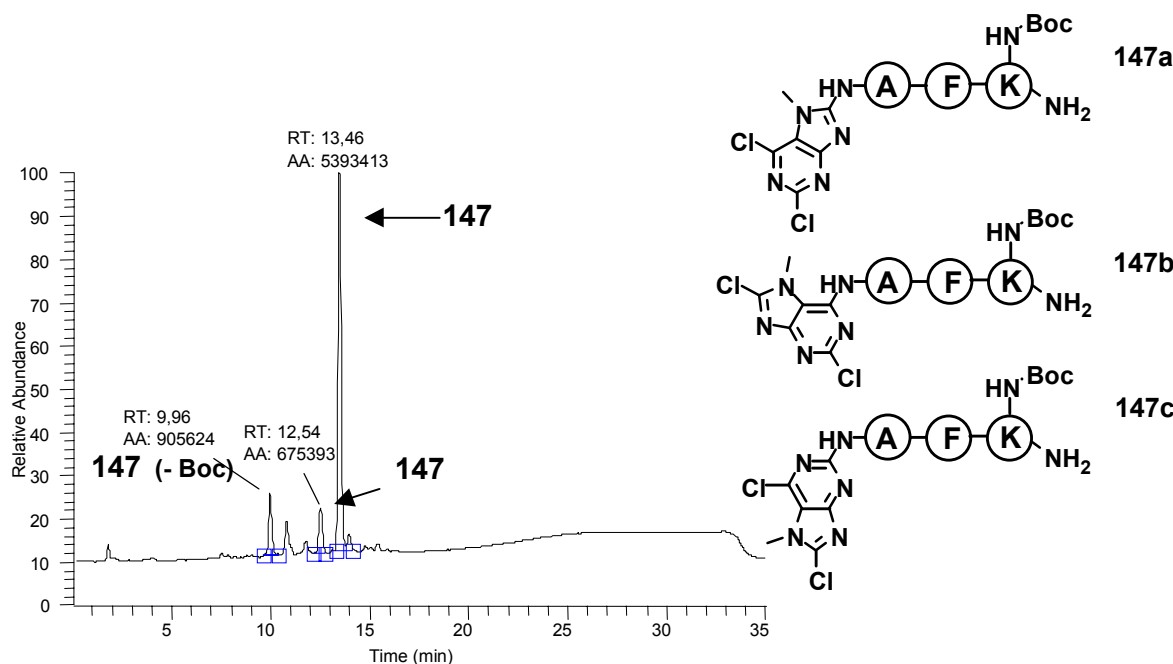
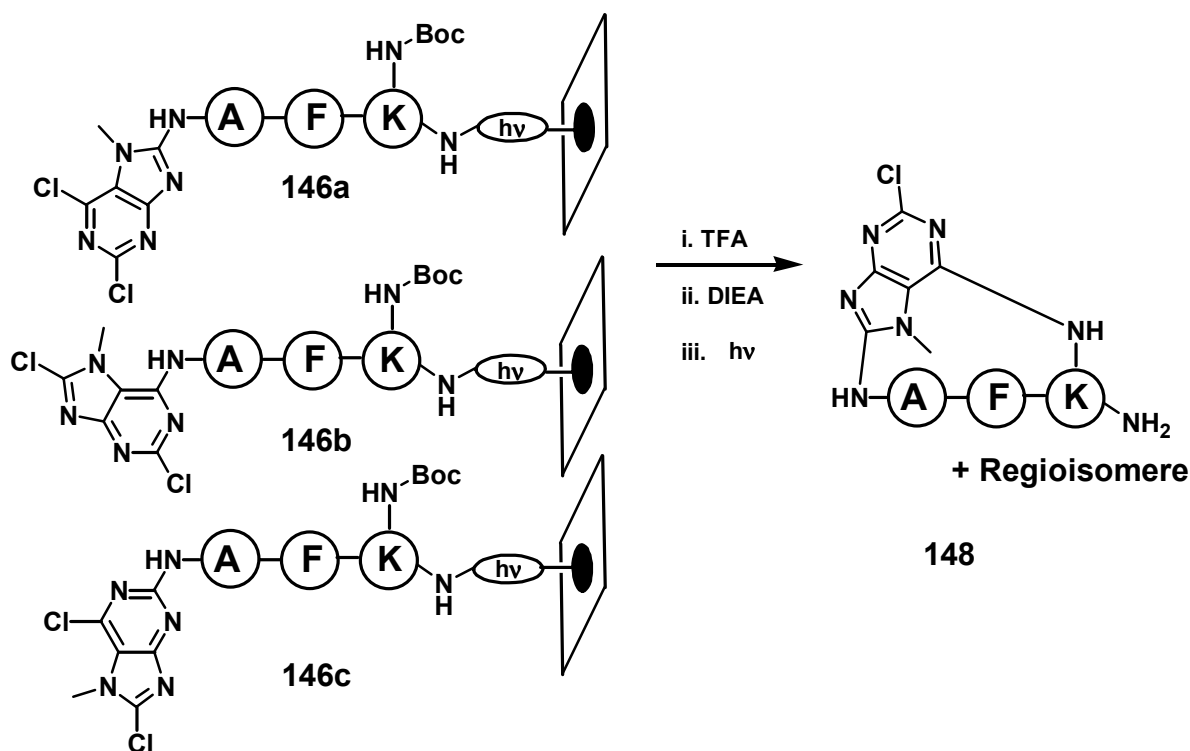


Abb. 19: HPLC-Chromatogramm der regioisomeren Dichlorpurin-Peptide; im Verlauf der Analytik kam es zu partiellen Boc-Entschüttung durch TFA im Lösungsmittel. Die gekennzeichneten Peaks zeigten die erwartete Masse für das Dichlorpurin-Peptidderivat.

Von den drei erwarteten Regioisomeren wurden scheinbar nur zwei erhalten. Es besteht die Möglichkeit, dass in dem Hauptpeak nicht nur ein, sondern zwei Regioisomere enthalten sind. Es gelang keine weitere Auftrennung durch verschiedene HPLC-Gradienten. MS-Fragmentierungsexperimente brachten diesbezüglich auch keinen Aufschluss, etwa durch unterschiedliche Fragmentierungsmuster, so dass es sich bei dem Hauptpeak vermutlich um ein Regioisomer handelt. Eine Zuordnung der Peaks des HPLC-Chromatogrammes zu den einzelnen Regioisomeren war nicht möglich. Da im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der geringen isolierten Substanzmengen keine Strukturaufklärung erfolgen konnte, bleibt es zu vermuten, dass es sich nach^[134] bei dem Hauptpeak in Abb. 19 um **147a** handelt.

Im Folgenden sollten geeignete Bedingungen zur nucleophilen Substitution eines der verbliebenen Chloratome am Purinring durch die ε -Aminogruppe des Lysins gefunden werden. Hier können sich aufgrund der Struktur des Purinringes eine Reihe von Regioisomeren bezogen auf die Orientierung des Heteroaromaten und des Peptides ergeben (Schema 42).



Schema 42: Intramolekulare Substitution am Dichlorpurinrest von **146** durch die ε-Aminogruppe des Lysins der Tripeptid-Einheit an der Zellulosemembran.

Für die intramolekulare Substitution am Dichlorpurinrest durch die ε-Aminogruppe des Lysins sollten geeignete Reaktionsbedingungen gefunden werden. In allen Fällen wurde eine 10 %-ige Lösung von DIEA in NMP verwendet. Die Variation der Reaktionstemperatur und -zeit sind zusammen mit den entsprechenden Cyclisierungsausbeuten und Reinheiten nach Abspaltung von der Zellulose in Tabelle 36 aufgeführt.

Tabelle 36: Bedingungen für die intramolekulare Substitution am Dichlorpurinrest durch die ε-Aminogruppe der Tripeptid-Einheit.

Nr.	Zeit	Temperatur	Cyclisierung ^a	Reinheit
	[h]	[°C]	[%]	[%]
1	4	RT	10	5
2	8	RT	15	10
3	4	50	25	23
4	8	50	41	34 ^b
5	2	80	64	59 ^b
6	8	80	73	62 ^b
7	3 min	> 100°C ^c	85	79
8	2 x 3 min	> 100°C ^c	90	79
9	3 x 3 min	> 100°C ^c	99	86

^a Summe der Regioisomere

^b teilweise Hydrolyse

^c Mikrowellenbestrahlung

Die Untersuchungen ergaben schlechte bis mittlere Umsetzungen für die Cyclisierung bei langen Reaktionszeiten (Nr. 1-6). Bei einer langen Reaktionszeit und erhöhten Temperaturen (Nr. 4-6) kam es zu einer Hydrolyse einzelner Chloratome am Purinring. Wie auch bei der nucleophilen Substitution am 2,4,6-Trichlorpyrimidin (Kapitel 3.6.1) lieferte die Reaktion unter Mikrowellenbestrahlung die besten Ergebnisse bzgl. Cyclisierungsausbeute und Reinheit (Nr. 7-9). Von den möglichen Regioisomeren nach Ringschluss konnten durch HPLC-MS Analytik nur zwei Isomere getrennt werden (Abb. 20).

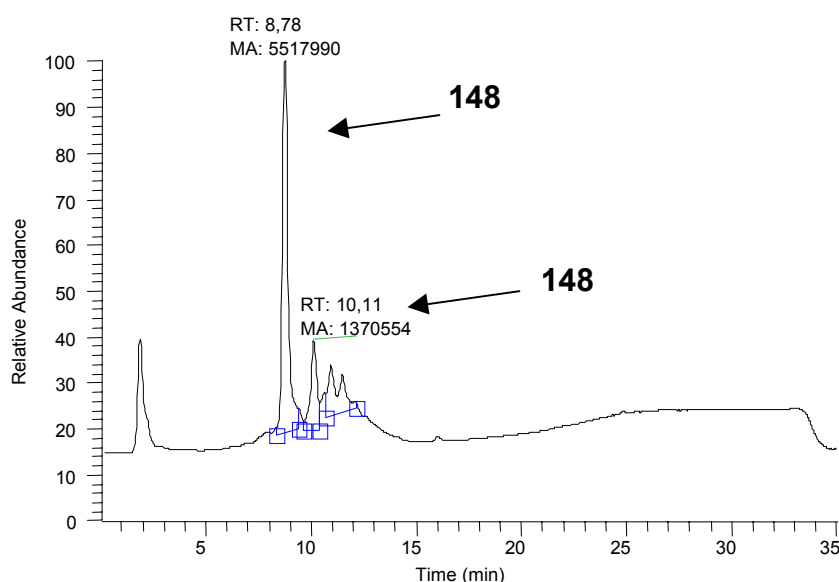


Abb. 20: HPLC-Spur der möglichen regioisomeren cyclischen Monochlorpurin-Peptide direkt nach der Abspaltung von der Zellulose.

Die nahezu vollständige intramolekulare Reaktion der ϵ -Aminogruppe des Lysins mit den Chloratomen des Purinderivates deutet auf keine spezielle regiochemische Hinderung einzelner Isomere hin. Hier zeichnet sich jedoch ein Nachteil der SPOT-Synthese ab. Es konnte nicht genug Material für exakte Untersuchung der Regiochemie der erhaltenden Produkte erreicht werden. Dennoch konnte gezeigt werden, dass an einem *N*-Terminus eines Peptides an der Zellulosemembran ein weiterer halogener Heteroaromat immobilisiert werden kann. Ferner gelang es Bedingungen zu finden, unter denen verbliebene Chloratome durch die ϵ -Aminogruppe des Lysins substituiert werden können.

3.7 Zusammenfassung: Möglichkeiten und Grenzen der *intramolekularen* S_NAr an halogenierten Heteroaromaten unter SPOT-Bedingungen

Die Cyclisierung einer Peptidsequenz durch die schrittweise nucleophile Substitution der Chloratome des Cyanurchlorids mittels Aminogruppe des Peptides stellt eine neue Methode zur Einschränkung der verfügbaren Konformationen dar.

Die Untersuchungen der Möglichkeiten dieser Methode haben folgende Ergebnisse geliefert:

- es sind Ringgrößen von 11 bis mindest. 37 Atomen zugänglich
- der Ring kann die gesamte Sequenz oder nur einen Teil umspannen
- soll nur ein Teil der Sequenz cyclisiert werden, so kann der Ringschluss von der Seitenkette zum *N*-Terminus oder zu einer weiteren Seitenkette erfolgen
- der Einsatz der selektiv spaltbaren Mtt-Schutzgruppe an der zur Cyclisierung zu verwendenden Lysinseitenkette können alle proteinogenen Aminosäuren (ausser Cystein) in der Peptidsequenz eingesetzt werden
- als lineare Sequenzen sind entweder Peptide, Peptomere oder Peptoide einsetzbar
- als halogenierte Heteroaromaten können Cyanurchlorid und 4,6-Dichlor-2-nitropyrimidin eingesetzt werden
- falls Regioisomere bzgl. der Orientierung des Heteroaromaten toleriert werden, können zusätzlich 2,4,6-Trichlorpyrimidin und 2,6,8-Trichloro-7-methyl-7*H*-purin eingesetzt werden

Eine zusätzliche Derivatisierung der cyclischen Peptidmimetika ist bei der Verwendung von Cyanurchlorid zur Cyclisierung möglich. Die nicht im Zuge des Ringschlusses substituierten Chloratome können durch Amine oder Phenolate ersetzt werden, um so die physiko-chemischen Eigenschaften der Makrocyclen zu variieren.

Erneut hat sich die Mikrowellenbestrahlung als geeignete Methode des Energietransfers bei nucleophilen Substitutionen erwiesen. So gelang es durch ihren Einsatz Produkte mit höherer Reinheit darzustellen, als durch Verwendung herkömmlicher Methoden zur Erwärmung. Bei der Untersuchung intramolekularer S_NAr-Reaktionen von weiteren mehrfach halogenierten Heteroaromaten mit (Modell-)Peptiden sollte ggf. Mikrowellenbestrahlung eingesetzt werden.

4 Einsatz von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken in biologischen Assay-Systemen

Im Anschluss an die Darstellung verschiedener [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken an planaren Oberflächen sollte untersucht werden, ob die erhaltenen Substanzbibliotheken zur Findung biologisch aktiver [1,3,5]-Triazine genutzt werden können. Biologische Assay-Systeme lassen sich bezüglich ihrer Durchführung in zwei Gruppen einteilen; Festphasen-Assays und Assays in Lösung. Im Fall der Festphasen-Assays werden entweder die zu testenden Substanzen oder der Bindungspartner z.B. ein Rezeptor an einer festen Phase immobilisiert, wobei die Bindung der Substanzen an den Rezeptor oder eine Verdrängung nativer Liganden gemessen wird. Bei Assays in Lösung hingegen befinden sich beide Komponenten, die Testsubstanzen und das biologische Material z.B. isolierte Säugetierzellen in einer „Lösung“ bzw. Suspension. Man beobachtet hierbei eine Vermehrung der Zellen oder die Produktion bestimmter Substanzen durch die Zellen.

Die Untersuchungen zur Einsetzbarkeit der mittels SPOT-Synthese erhaltenen [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken wurde an je einem Modellsystem beider Assayformate durchgeführt. Für die Durchführung eines Festphasen-Screenings an der Zellulosemembran sollte der bereits gut etablierte monoklonale Antikörper (mAk) TAB-2 verwendet werden.^[35, 36, 38, 71] Neben der Verfügbarkeit des jeweiligen Systems spielte im Fall des Assays in Lösung auch die pharmakologische Bedeutung eine Rolle. So wurde für diese Untersuchungen ein Assay zur Auffindung von agonistischen Somatostatinanaloga gewählt. Da es sich bei der Stammverbindung, dem Somatostatin S14, um ein 14-meres cyclisches Peptid handelt, sollte für die Entwicklung von Analogia zusätzlich die neue Methode zur Darstellung cyclischer Peptidmimetika eingesetzt werden.

4.1 Bindungsassays an Festphasen-gebundenen [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken mit einem monoklonalen Antikörper

Bindungsassays an fester Phase sind ein häufig eingesetztes Werkzeug zur raschen Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen und immobilisierten Peptiden.^[18, 33, 35, 40, 88] Im Fall des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörpers (mAk) TAB-2 für Festphasenbindungsstudien erfolgte der Nachweis der an die jeweiligen Peptide gebundenen Antikörper durch einen zweiten, Peroxidase(POD)-markierten Antikörper mittels einer Chemolumineszenzreaktion (Abb. 21).^[41]

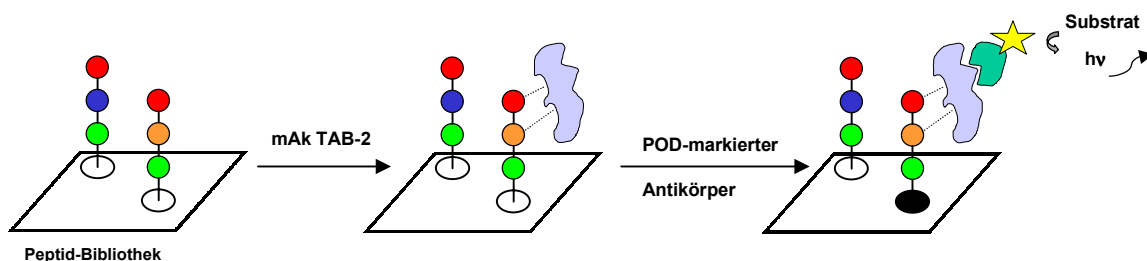


Abb. 21: Nachweis von Peptid-mAk-TAB-2-Wechselwirkung an einer Zellulosemembran durch einen zweiten POD-markierten Antikörper (POD = Peroxidase, Substrat: Chemolumineszenz-Substrat auf Luminol-Basis).

Die membrangebundene Peptid-Bibliothek wurde mit einer Lösung des mAk TAB-2 inkubiert. Nach Entfernen des überschüssigen Antikörpers durch Waschschritte, wurden die

gebundenen Antikörper mit einem POD-markiertem Antikörper und einem Chemolumineszenz-Substrat nachgewiesen. Bei einer digitalen Detektion (LumiImager™) erscheinen die SPOTs mit gebundenem Antikörper dunkel, wobei die Signalintensitäten (Schwarzfärbung) eine quantitative Abschätzung der Bindungsstärke ermöglicht. Als Kontrolle ging der Inkubation mit mAk TAB-2 eine Behandlung der Membran mit dem zweiten Antikörper voraus, die keine Signale zeigte. Diese Kontrollinkubation stellt sicher, dass der Nachweisantikörper nicht die membrangebundenen Peptide direkt bindet, und so falsch positive Werte liefern würde.^[35]

Der mAk TAB-2 erkennt die lineare Sequenz VVSHFND aus dem *N*-Terminus des *transforming growth factor*(TGF)- α .^[36, 71] Mittels einer sog. Substitutionsanalyse konnte die Bindung des Peptides genauer untersucht werden. Dazu wurden alle 140 Peptide (20 Aminosäuren in sieben Positionen) synthetisiert, die sich in *einer* Aminosäure von der Ausgangssequenz („Wildtyp“) VVSHFND unterscheiden. Nach der Synthese wurde die Membran mit dem Antikörper inkubiert und die Bindung als dunkle Färbung visualisiert.^[36, 102] An Zeilen, die viele bindende SPOTs aufweisen, erkennt man Positionen des Ausgangspeptids, die verschiedene Aminosäuren tragen können, ohne dass die Bindung zum Antikörper verloren geht (in Abb. 22, die oberen beiden Zeilen, die eine Austauschbarkeit der *N*-terminalen Valin-Bausteine signalisieren).^[36, 102] Im Gegensatz dazu zeigen Zeilen, die nur wenige bindende SPOTs aufweisen, nicht oder nur eingeschränkt substituierbare *Schlüsselpositionen* an (im gezeigten Beispiel die fünf *C*-terminalen Positionen SHFND).^[36, 71] Synthese und Screening der gezeigten Peptid-Bibliothek erforderte dabei den geringen Zeitaufwand von drei Tagen für diese Substitutionsanalyse.

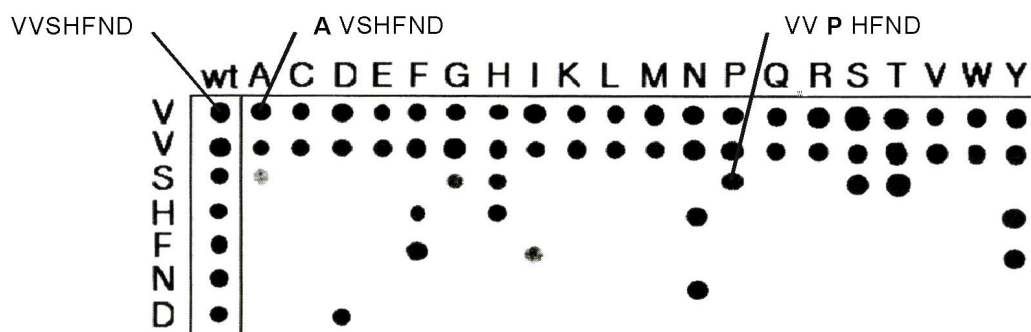


Abb. 22: Substitutionsanalyse des Hepta-Peptids VVSHFND: 140 (7 x 20) Peptide zzgl. 7 Kopien des Wildtyps (wt) wurden an einer Zellulosemembran (6 x 13 cm) synthetisiert und mit mAk TAB-2 inkubiert. Dunkle SPOTs zeigen Bindung des Antikörpers, und unterscheiden sich in einer Aminosäure (hervorgehoben in den angegebenen Sequenzen).^[35, 102]

Es zeigt sich, dass die Bindung im *C*-terminalen Bereich des Peptides (SHFND) durch Kontakte zu den Seitenketten charakterisiert ist, während an den Positionen der beiden *N*-terminalen Valin-Bausteine Kontakte zum Rückgrat bestehen.^[35] Durch kombinatorische Peptid-Bibliotheken an Zellulose und unter Verwendung der *phage-display*-Technik konnte das Bindungsmotiv auch *de novo* identifiziert werden.^[38]

Bei der Suche nach Bindungspartner mittels *de novo* Strategien in der Peptidchemie an Zellulose wurde im allgemeinen mit Peptiden aus 6-14 Aminosäuren gearbeitet, die in zwei bis drei Positionen eine definierte Aminosäure besitzen, während die anderen Positionen als Gemische vorliegen. Ein SPOT einer solchen Bibliothek kann beispielsweise eine Sequenz des Typs XXB_1B_2XX besitzen, in der die mittleren Positionen zwei bestimmte Aminosäuren B_1 und B_2 tragen, während an den übrigen Positionen Mischungen aus 20 Aminosäuren zur Synthese eingesetzt werden, so dass letztlich eine sehr grosse Zahl an Sequenzen pro SPOT vorliegt.^[40, 41, 102]

Im Gegensatz zu den oben beschriebenden Peptiden wurde für die [1,3,5]-Triazin-Bibliothek aufgrund der geringen Molekülgrösse eine relativ schwache Bindung erwartet, so dass keine Mischungen sondern einzelne, definierte Verbindungen auf jedem SPOT synthetisiert werden sollten. Bei der Verwendung einer 20 x 30 cm Zellulosemembran lassen sich 8000 Einzelverbindungen mit einer „Dichte“ von ca. 25 SPOTs pro cm² synthetisieren.^[45, 102]

Die Planung einer kombinatorischen Substanzbibliothek ist eine komplizierte Aufgabe. Für die *de novo* Entdeckung von Bindungspartnern zu vorgegebenen Proteinen ist meist das Ziel eine Bibliothek mit möglichst grosser Diversität zu entwerfen. Die Beurteilung der Diversität wurde von vielen Arbeitsgruppen bearbeitet, ist jedoch noch nicht abschliessend gelöst.^[135-140] Da viele Pharmaka durch Bindung an ein grosses Protein wie z.B. einen Rezeptor ihre Wirkung entfalten,^[141] bietet ein Vergleich der Zielbibliothek mit bereits eingesetzten Pharmaka ein Kriterium zur Beurteilung der Erfolgsaussicht für die geplante Bibliothek.^[142] Generell haben sich folgende Kriterien als besonders wichtig erwiesen; die Anzahl an H-Akzeptor- und H-Donor-Gruppen, das Molekulargewicht und der logP-Wert. Die Anzahl der H-Akzeptor-Gruppen sollte ungefähr 5, die der H-Donor-Gruppen ca. 8-10 betragen, beide sind u.a. für Bindungseigenschaften sehr wichtig.^[141] Die Molekülgrösse hat einen entscheidenden Einfluss auf die Bioverfügbarkeit der Verbindung, wobei kleinere Moleküle in der Regel besser im Organismus verfügbar sind als grosse. Als Mass wurde hier das Molgewicht herangezogen, das unter 500 g/mol liegen sollte. Der logP-Wert der zu synthetisierenden Verbindungen gibt den Verteilungskoeffizienten der Verbindung zwischen *n*-Octanol und Wasser an, wobei hohe Werte bedeuten, dass die Verbindung unpolar ist. Der logP-Wert sollte unter 5 liegen, um eine gute Membrangängigkeit der Verbindung zu gewährleisten.^[67]

Die Beurteilung der Diversität konnte hier nur sehr subjektiv erfolgen, da das zentrale Strukturelement durch den [1,3,5]-Triazinring vorgegeben war. Für den Entwurf der Bibliothek an Zellulose waren zwei Punkte zu beachten; es sollten die Auswahlkriterien speziell die Anzahl an H-Akzeptor- und H-Donor-Gruppen möglichst gut erfüllt werden, und es sollten nur die Bausteine eingesetzt werden, die in den Testsynthesen gute Ergebnisse geliefert haben. Da die Synthese an einer Zellulosemembran erfolgen sollte, wurde die Auswahl der Bausteine zur Substitution der Chloratome am membrangebunden Di- und Monochlor-[1,3,5]-triazin auf die Amine beschränkt, die in vorherigen Untersuchungen (vgl. Kapitel 2.4.1 und 2.5.1) gute bis sehr gute Ergebnisse geliefert haben.

Bei der Gestaltung der [1,3,5]-Triazin-Bibliothek musste bedacht werden, dass eine Schwierigkeit im Auftragen der Amine im 8000-er Format für die Substitution des letzten Chloratoms am Triazinring besteht, da hier ca. 0,1 µl/SPOT verwendet werden. Bis der letzte SPOT mit Aminlösung benetzt werden kann, sind die ersten schon fast wieder eingetrocknet, bevor eine Erwärmung erfolgen konnte. Ferner war eine homogene Bestrahlung der Membran durch Mikrowellen in dem zur Verfügung stehenden Mikrowellenofen nicht gewährleistet. Aus diesen beiden Gründen wurde die Chlorsubstitution an den Monochlor-[1,3,5]-triazinen mit einem Amin für die gesamte Membran unter Verwendung einer Heizmatte als Heizquelle durchgeführt.

Der Einbau von Aminosäuren bietet die Möglichkeit, eine möglichst grosse Anzahl an biologisch relevanten funktionellen Gruppen einzusetzen. Zur Kombination dieser Gruppen wurde eine virtuelle Bibliothek aus 400 Dipeptiden bestehend aus den 20 proteinogenen Aminosäuren (R¹ und R²) entworfen. Am *N*-Terminus wurde Cyanurchlorid immobilisiert und das zweite Chloratom mit 20 unterschiedlichen Aminen (R³) substituiert. Das verbleibende dritte Chloratom wurde mit Piperidin substituiert (Abb. 23).

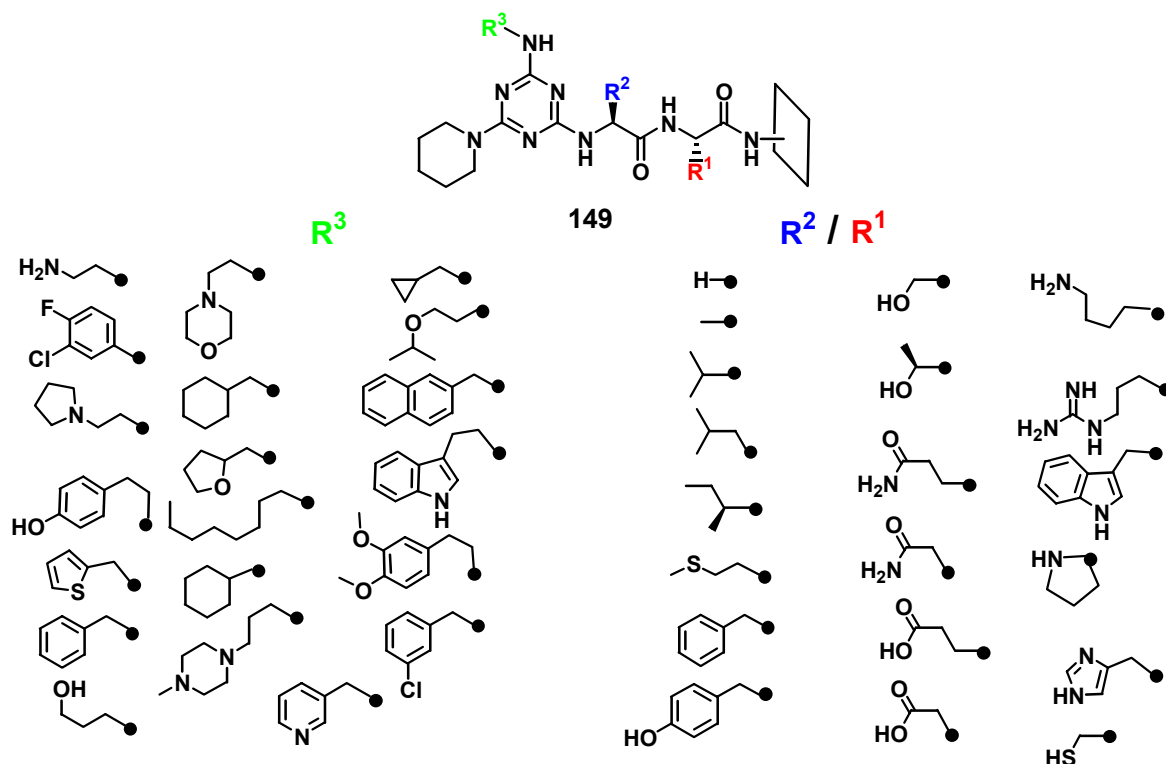


Abb. 23: Entwurf der [1,3,5]-Triazin-Bibliothek aus 8000 Einzelverbindungen.

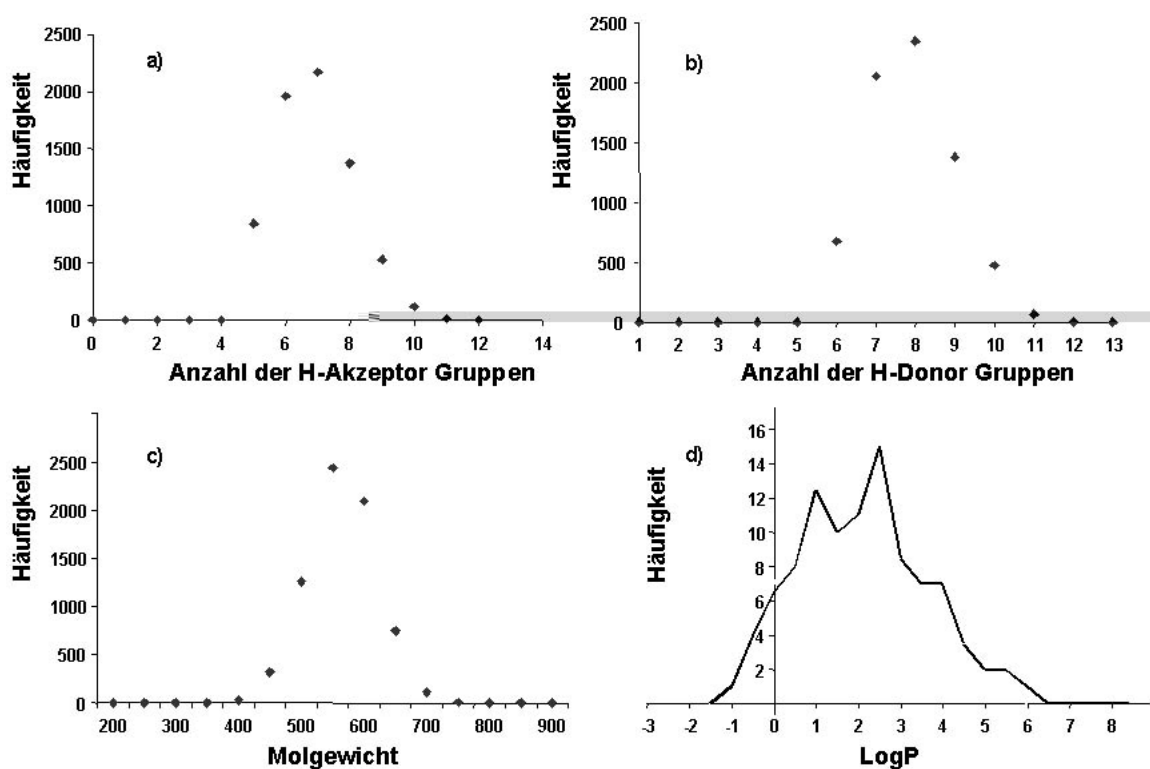
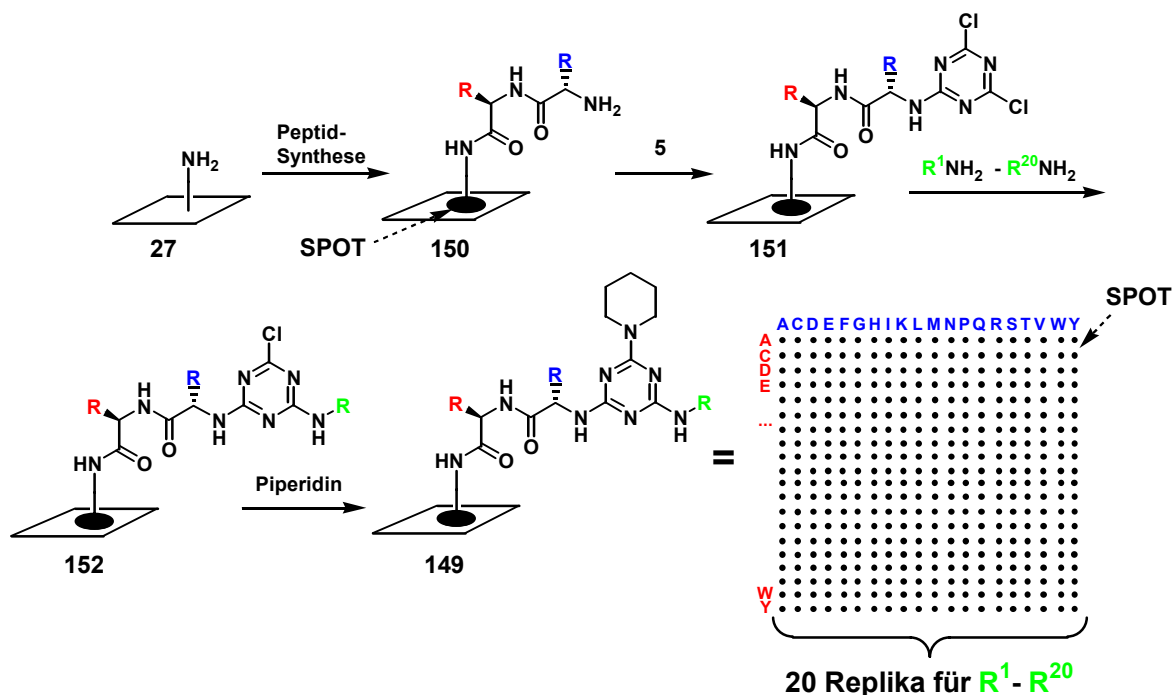


Abb. 24: Verteilung der Häufigkeit der a) H-Akzeptor-, b) H-Donor Gruppen, c) des Molgewichtes und d) einzelner logP-Wert in der [1,3,5]-Triazin-Bibliothek aus 8000 Einzelverbindungen ermittelt mit dem Programm ChemX.

Die virtuelle Bibliothek wurde mit dem Programm ChemX^[143] erstellt und die Anzahl an H-Akzeptor- und H-Donor-Gruppen, Molekulargewicht und logP-Wert jeder der 8000 Verbindungen berechnet. Die Verteilungen bzgl. der Häufigkeit der einzelnen Parameter ist in Abb. 24 graphisch dargestellt.

Da es vor Beginn der Untersuchungen unklar war, ob prinzipiell durch diese Art von Festphasen-Screening mit [1,3,5]-Triazinen Bindungspartner für den mAk TAB-2 gefunden werden können, war es wichtig eine Bibliothek zu entwerfen, die eine möglichst optimale Anzahl von H-Donor- und H-Akzeptor-Gruppen aufwies. Die Berechnungen ergaben, dass die Parameter der meisten geplanten Verbindungen sich in den optimalen Bereichen (bezogen auf^[67]) befinden. Leichte Abweichungen sind allerdings tolerierbar.^[144] Die Aussage über den logP-Wert ist bezogen auf das Festphasen-Screening von geringer Bedeutung, bietet jedoch einen Anhaltspunkt für die Löslichkeit und Membrangängigkeit der Verbindungen in nachgeschalteten Untersuchungen. Aufgrund der positiven Ergebnisse der Berechnungen der wichtigen Parameter (bezogen auf mögliche Bindungspartner) der Verbindungen wurde mit der Synthese der Bibliothek an einer Zellulosemembran begonnen. Den Anfang stellte die Synthese aller möglichen Dipeptide aus proteinogenen Aminosäuren dar. Die Synthese erfolgte auf einer 20 x 30 cm grossen aminoderivatisierten Zellulosemembran. Die Verteilung der Aminosäure-Pentafluorphenylesterlösung konnte durch einem Pipettierautomaten automatisiert werden. Die jeweilige Sequenz der Peptide mit der dazugehörigen Position der zu spottenden Aminosäurelösung wurde mittels einer speziellen Software (LISA, Vers. 1.53) festgelegt. Die 400 Dipeptide wurden blockweise in 20 Replika (5 x 4 Blöcke) auf der Zellulosemembran synthetisiert. Nach Reaktion des Cyanurchlorids mit dem jeweiligem N-Terminus der Dipeptide wurde jeweils ein Amin auf einen der 20 Blöcke aufgetragen. Das letzte Chloratom am [1,3,5]-Triazinring wurde mit Piperidin substituiert (Schema 43).



Schema 43: Syntheseschritte für die [1,3,5]-Triazin-Bibliothek aus 8000 Einzelverbindungen.

Die Position der verwendeten Amine zur Chlorsubstitution auf der Zellulose entspricht der Position in der schematischen Darstellung der fertigen Membran in Abb. 25.

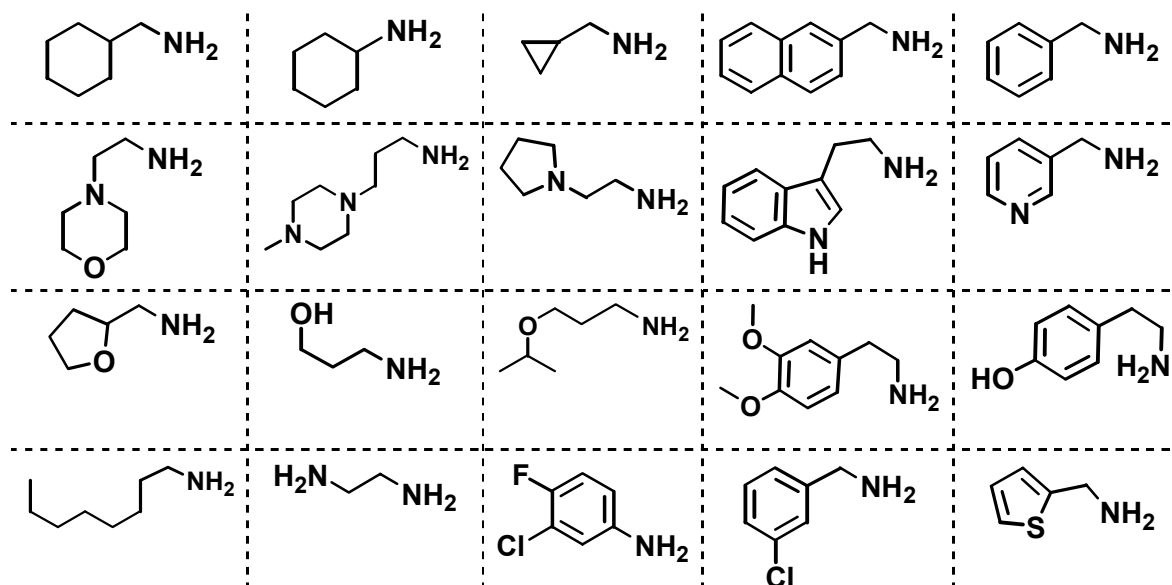


Abb. 25: Verteilung der Amine in der [1,3,5]-Triazin-Bibliothek. Jeder Block der Amine repräsentiert 400 Verbindungen bestehend aus einer Dipeptid- und einer Triazin-Hälfte (vgl. Schema 23).

Um falsch-positive Resultate durch Bindung des POD-markierten Nachweisantikörpers an den [1,3,5]-Triazinen auszuschliessen, erfolgte vorab eine Kontrollinkubation der membrangebundenen Bibliothek. Nachdem keine signifikante Bindung detektiert wurde, konnte die eigentliche Untersuchung mit dem mAk TAB-2 durchgeführt werden. Der Nachweis der Bindung des mAk TAB-2 an die einzelnen Verbindungen der [1,3,5]-Triazin-Bibliothek erfolgte durch den zweiten POD-markierten Antikörper (vgl. Abb. 21) in Form dunkler SPOTs (Abb. 26). Zur Positivkontrolle der Bindungsstudien (Bestätigung der Funktionalität des Antikörpers an der Zellulosemembran) wurde das sechsmere VSHFND (Kontrolle) auf der Zellulosemembran immobilisiert.

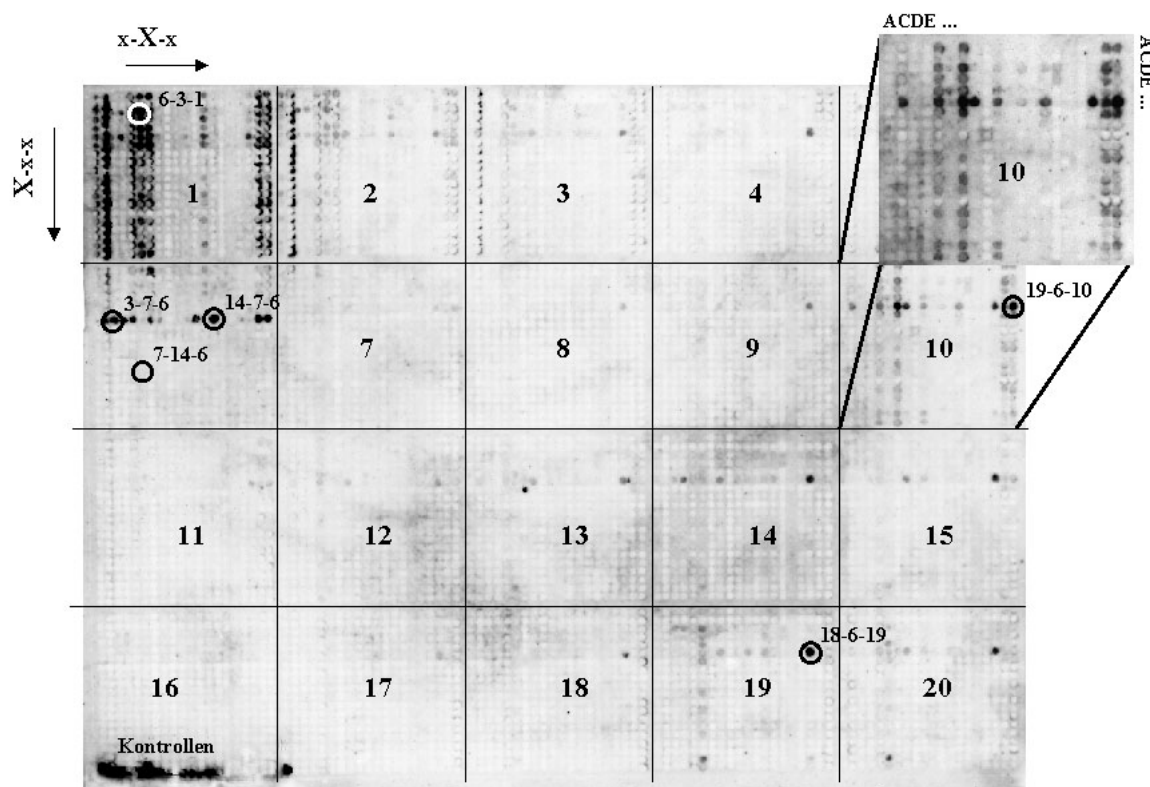


Abb. 26: Bindung des mAk TAB-2 an einzelnen SPOTs der Bibliothek aus 8000 [1,3,5]-Triazinderivaten **149**. Die Visualisierung erfolgte durch einen POD-markierten Nachweisantikörper, Umsatz mit einem Chemolumineszenz-Substrat und digitale Detektion der Lumineszenz (LumiImager™).

Die Bindungsstudie zeigte, dass sowohl eine Präferenz des mAk TAB-2 gegenüber dem Cyclohexylmethyl-Rest (Block 1, Abb. 26 links oben) bestand, als auch einige sequenzspezifische Bindungen des Antikörpers (einzelne SPOTs z. B. in den Blöcken 14, 15 und 19) detektiert werden konnten. Die Numerierung der einzelnen SPOTs auf der Zellulose erfolgte in Anlehnung an die Synthese der Verbindungen. So wurde die erste Aminosäure von dem Pipettierautomaten in Spalten gespottet. Die erste Zahl jedes Dreier-Codes (vgl. Kapitel 2.6) der SPOTs gibt die C-terminale Aminosäure an, wobei die Nummer der alphabetischen Reihenfolge im „Ein-Buchstaben-Code“ entspricht (1 für A, 2 für C, 3 für D usw.). Die zweite Zahl entspricht der N-terminalen Aminosäure des Dipeptides in gleicher Numerierung. Die letzte Zahl des dreier Codes steht für das verwendete Amin des Blockes wie in Abb. 25 gezeigt, also 1 für Cyclohexylmethyamin oder 5 für Benzylamin. Der markierte SPOT **149-(18-6-19)** in Abb. 26 (spezifische Bindung durch den Antikörper TAB-2) trägt somit die folgende Sequenz C-terminales Valin, dann Glycin und zur Substitution des zweiten Chloratoms 3-Chlorbenzylamin.

Die Bindung des mAk TAB-2 an den zellulosegebundenen [1,3,5]-Triazinen muss nicht an dem Paratop (der für eine Bindungsspezifität verantwortliche Oberflächenbereich), sondern kann auch unspezifisch an einem konstanten Bereich erfolgen. Zur Untersuchung der Bindungsspezifität wurde ein kompetitiver ELISA^[145] durchgeführt. Hierbei wurde in den Reaktionskammern einer Mikrotiterplatte ein Teil des nativen Bindungspartners des mAk TAB-2 kovalent verankert (VVSHFNDPCDSHTQFAF; der N-terminale Teil des TGF- α). In die derart modifizierten Reaktionskammern wurden nun die zu testenden Verbindungen (einzeln in unterschiedlichen Konzentrationen) und eine konstante Menge des markierten

mAk TAB-2 gegeben. Nach Waschen der Kammern wurde die Enzymaktivität und damit die Menge an gebundenem Antikörper in den einzelnen Kammern mittels eines chromogenen Substrates gemessen. Eine geringe Menge an detektierbarem Antikörper TAB-2 signalisiert eine gute Bindung der zugegebenen Testsubstanz an das Paratop, da dann wenig TAB-2 an den derivatisierten Reaktionskammern gebunden hat. Aus der Konzentrationsreihe der einzelnen Verbindungen ergeben sich die Inhibitionskonstanten IC₅₀ (IC₅₀ entspricht einer Konzentration mit halb-maximalen Inhibition).

Um die Bindungsspezifität der identifizierten Verbindungen der SPOTs zu überprüfen wurden exemplarisch einige Sequenzen für ELISA-Experimente ausgewählt. Die sechs Verbindungen (vgl. Abb. 26, alle eingekreisten SPOTs) wurden am Rink-Harz synthetisiert, um für weitere Untersuchungen ausreichend Substanzmengen zur Verfügung zu haben. Die Auswahl erfolgte nicht nur nach Signalstärke, sondern es wurde auch auf den Einfluss der Aminosäuren. So wurden aus Block 6 (4-(2-Aminoethyl)morpholin) SPOTs mit anderen Aminosäureresten gewählt, als die, die schon im Block 1, 10 oder 19 vertreten waren. Der SPOT **149-(7-14-6)** hingegen zeigte keine signifikante Bindung des Antikörpers und wurde als Negativkontrolle gewählt, um event. falsch-negative Ergebnisse zu untersuchen. Zur besseren Unterscheidung sind diese Verbindung nur mit dem Dreier-Code bezeichnet, also **149-(18-6-19)** für die zellulosegebundenen und **18-6-19** für die vom Harz abgespaltene Verbindung.

Zwei der sechs Verbindungen zeigten in kompetitiven ELISA-Experimenten eine deutliche Inhibition der Bindung des mAk TAB-2 an das immobilisierte Peptidpitop. Die Detektion des Antikörpers in Abhängigkeit der Konzentration an zugesetzten [1,3,5]-Triazinderivaten ist in Abb. 27 gezeigt.

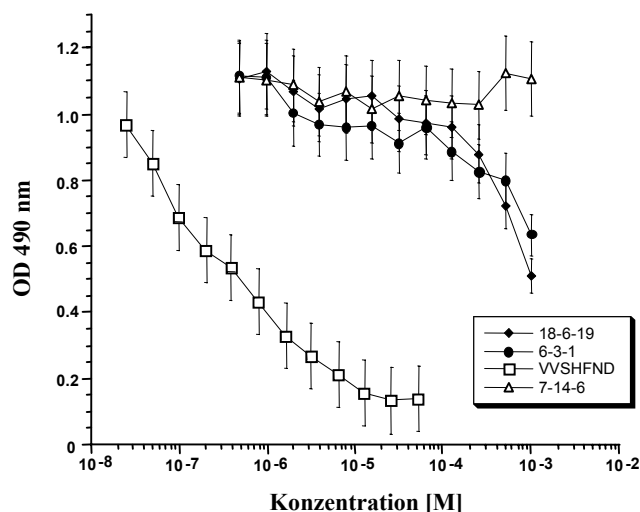
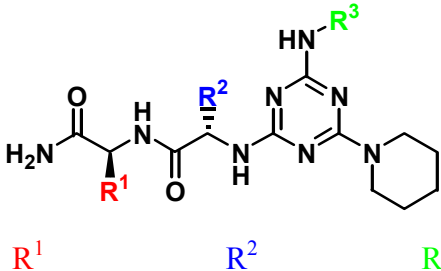


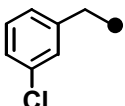
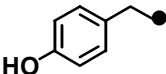

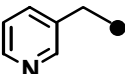
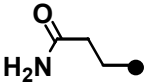
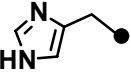
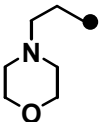
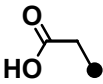
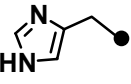
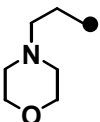

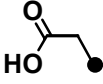
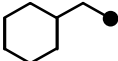
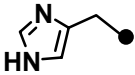
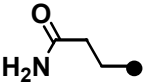
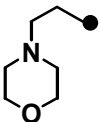


Abb. 27: Inhibition der Bindung des mAk TAB-2 an das festphasengebundene Peptidpitop VVSHFND *CPDSHTQFAF* durch die Verbindungen **18-6-19**, **6-3-1** und das Peptid VVSHFND in ELISA-Experimenten. Die Negativkontrolle **7-14-6** zeigt keine Inhibition.

Die sechs ausgewählten Verbindungen, die Ergebnisse aus dem Festphasen-Screening und dem kompetitiven ELISA sind in Tabelle 37 zusammengefasst. Die angegebenen IC₅₀-Werte aus dem ELISA-Experimenten entsprechen dem jeweiligen Mittelwert aus drei Bestimmungen.

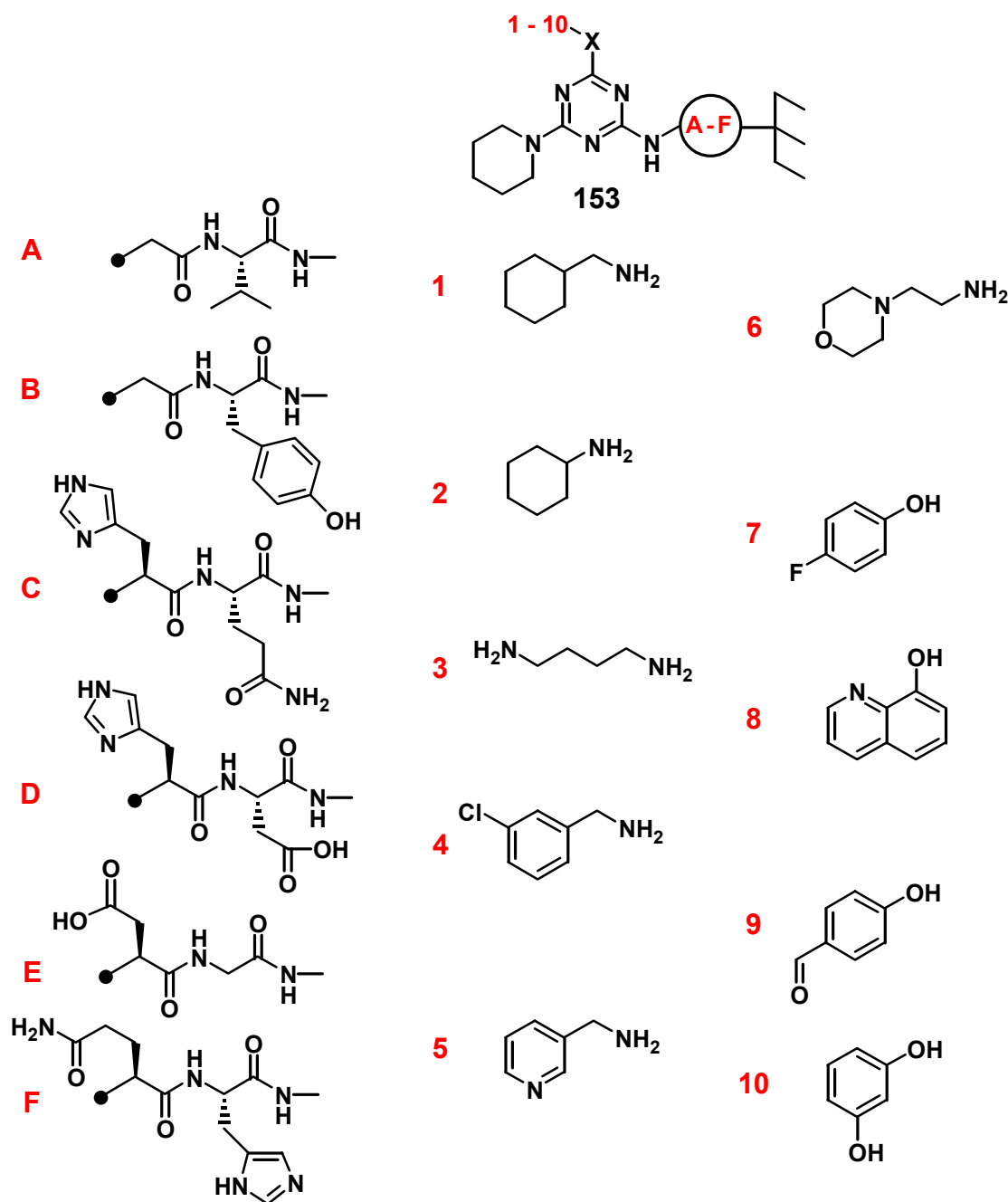
Tabelle 37: Ausgewählte mAk-TAB-2 bindende Trisamino-[1,3,5]-triazine **149** in Festphasen-Screening und in ELISA-Experimenten.

Nr.				Intensität [BLU] ^a	IC ₅₀ aus ELISA [μmol]
18-6-19				$2,2 \times 10^6$	600 ± 300
19-6-10				$1,9 \times 10^6$	$> 10^6$
14-7-6				$2,3 \times 10^6$	$> 10^6$
3-7-6				$1,9 \times 10^6$	$> 10^6$
6-3-1				$1,9 \times 10^6$	400 ± 300
7-14-6				$1,1 \times 10^5$	$> 10^6$

^a BLU = Boeringer light units

Drei der Verbindungen zeigten im Festphasen-Screening eine Bindung des mAk TAB-2 im ELISA-Experiment jedoch keine Inhibition der Bindung zu dem immobilisiertem Epitop, was folgende Gründe haben kann; Zum Einen kann die Bindung der [1,3,5]-Triazine nicht zum Paratop des Antikörpers erfolgen, zum Anderen ist die Sensitivität des Festphasen-Screenings sehr hoch,^[45] so dass eine Inhibition aufgrund von nicht erreichbaren Konzentrationen im ELISA nicht detektierbar ist. Ferner besteht die Möglichkeit, dass die Zellulose oder der Spacer (4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin) zwischen der Oberfläche der Membran und den [1,3,5]-Triazinen zu der Bindung des Antikörpers einen Beitrag liefert. Die zwei weiteren Verbindungen (**18-6-19** und **6-3-1**) zeigten jedoch eine signifikante Inhibition im ELISA-Experiment. Trotz der geringen Affinität konnte gezeigt werden, dass sich mittels SPOT-Synthese und Festphasen-Screening kleine organische Moleküle finden lassen, die immerhin ein 17-meres Peptid an der Bindungsstelle verdrängen.

Als nächstes wurde die Verwendbarkeit der derivatisierten PP-Membran hinsichtlich des Festphasen-Screenings mit dem mAk TAB-2 untersucht. Hierzu wurde eine kleine eingeschränkte (fokusierte) Bibliothek entworfen, die sowohl Verbindungen aus der ersten [1,3,5]-Triazin-Bibliothek, als auch für eine Optimierung zusätzlich einige bislang noch nicht eingesetzte amino-oxy-substituierte [1,3,5]-Triazine enthielt. Die Kernstruktur der Bibliothek und die verwendeten Bausteine sind in Schema 44 dargestellt.



Schema 44: Gestaltung der Folgebibliothek. 6 Dipeptidsequenzen (A-F) wurden in Zeilen synthetisiert, nach Immobilisierung von Cyanurchlorid wurden 10 Nucleophile (1-10) zur Monochlorsubstitution eingesetzt. Das verbleibende Chloratom jeder Verbindung wurde mit Piperidin umgesetzt.

Die Synthese der [1,3,5]-Triazin-Bibliothek erfolgte sowohl auf einer aminoderivatisierten Zellulose- als auch auf einer PP-Membran. Der Einsatz der PP-Membran ermöglichte die

Verwendung von vier Phenolen (Nucleophile 7-10), da diese zuvor an dieser planaren Oberfläche gute Ergebnisse lieferten (vgl. Kapitel 2.4.2). Die Kontrollinkubation der Membran mit dem POD-Nachweisantikörper, die Inkubation mit dem mAk TAB-2 und dem POD-Nachweisantikörper mit anschließender digitaler Detektion an dem LumiImager™ sind in Abb. 28 gezeigt (a und c mit POD, b und d mit TAB-2 und POD-Kontrollinkubationen).

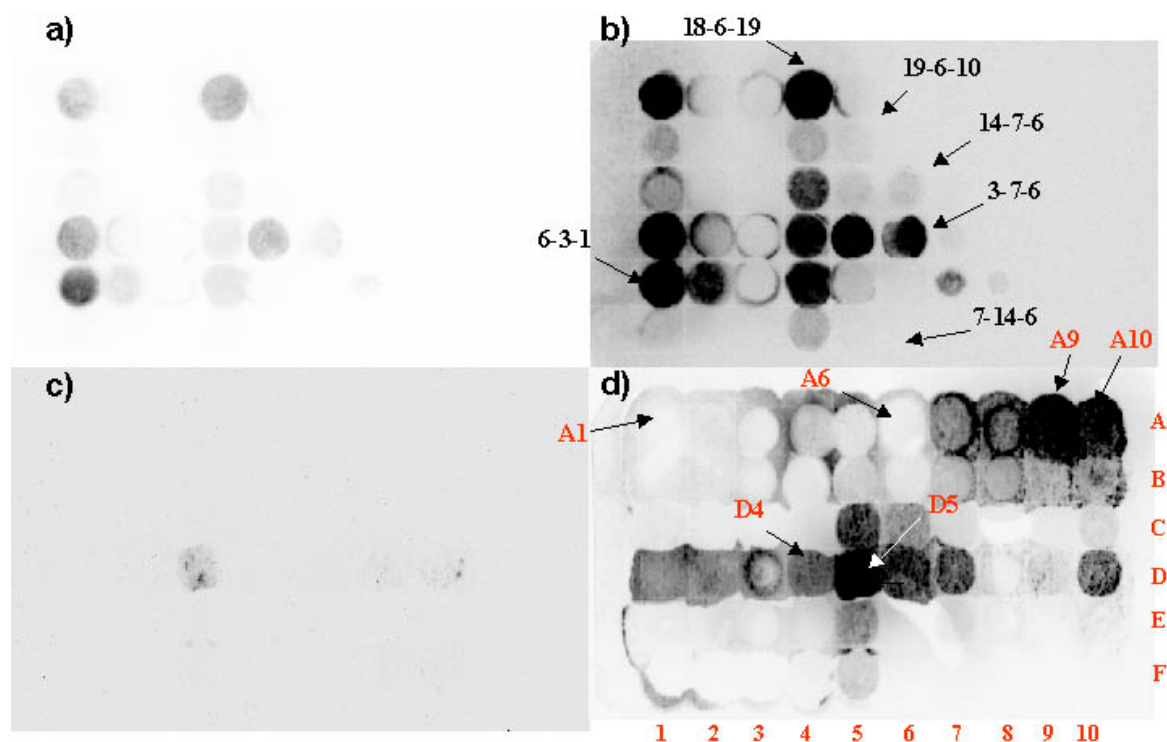
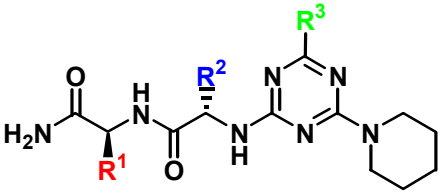

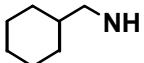

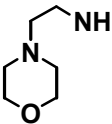

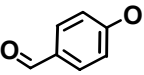

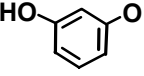
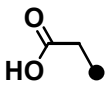
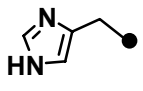
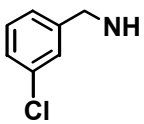
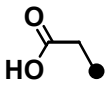
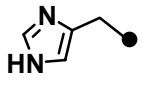
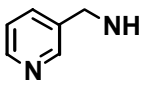


Abb. 28: Bindungsstudien an [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken **153** synthetisiert an Zellulose- (a und b) und PP-Membran (c und d). Die Kontrollinkubation (a und c) zeigt an der Zellulose geringe, an der PP-Membran keine Bindung des POD-markierten Antikörpers. Die Zahlen in der Abbildung codieren die jeweiligen Reste von **153**.

Die beiden festphasengebundenen [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken in Abb. 28 enthaltenden die selben Verbindungen. Lediglich das Material der planaren Oberfläche und der Derivatisierungsgrad unterscheiden sich (150 nmol/cm² an der Zellulosemembran zu 90 nmol/cm² an der PP-Membran). Zur besseren Orientierung sind die SPOTS, die zuvor aus der ersten Bibliothek, bestehend aus 8000 Verbindungen, ausgewählt wurden auf der Zellulosemembran durch Pfeile gekennzeichnet. Diesmal zeigen die SPOTS **153-(19-6-10)** und **153-(14-7-6)**, die im ELISA-Experiment keine Inhibition aufwiesen, eine deutlich geringere Bindung zum mAk TAB-2. Im Vergleich zu dem Bindungsmuster auf der Zellulose fallen auf der PP-Membran einige weitere SPOTS auf. Die auf der Zellulose als bindend detektierten SPOTS **153-(3-7-6)** und **153-(18-6-19)** erschienen heller, der SPOT **153-(6-3-1)** zeigte keine Bindung zum mAk TAB-2 und blieb weiss. Diese Beobachtung kann durch die Art der Auswertung der Bindung der SPOTS zum Antikörper mittels digitaler Auswertung bedingt sein. Die Auswertung mit dem LumiImager™ liefert immer nur relative Werte, d.h. die SPOTS in der oberen Zeilen in den letzten beiden Spalten können die anderen „überstrahlen“. Ferner ist der Einfluss der planaren Oberfläche bei der Bindung des Antikörpers nicht klar. Neben einer unterschiedlichen Benetzbarkeit können z.B. Hydroxylgruppen der Zellulose einen Einfluss ausüben.

Zur Beurteilung der Ergebnisse wurden sechs SPOTs ausgewählt, um die entsprechenden Verbindungen am Synthescharz zu synthetisieren. Die ausgewählten SPOTs sind in Abb. 28 an der PP-Membran markiert, wobei sich die Benennung nach den Koordinaten richtet. Der SPOT **153-A6** wurde hierbei als Negativkontrolle gewählt, da er weder auf Zellulose, noch auf der PP-Membran eine Bindung zum mAk TAB-2 zeigte. Die Verbindungen wurden nach Aufreinigung mittels HPLC in dem gleichen kompetitiven ELISA^[145] getestet wie die zuvor aus der anfänglichen Bibliothek ausgewählten Verbindungen. Die Ergebnisse der Bindungsstudien an den planaren Oberflächen im Vergleich zu den ELISA-Experimenten sind in Tabelle 38 zusammengestellt.

Tabelle 38: Ausgewählte mAk-TAB-2 bindende Trisamino-[1,3,5]-triazine im Festphasen-Screening an Zellulose- und PP-Membran sowie im kompetitiven ELISA.

Nr.	 153			Intensität x 10 ³ [BLU] ^a		IC ₅₀ aus ELISA [μmol]
	R ¹	R ²	R ³	Zellulose	PP-Membran	
A1		H		154,5	6,5	500 ± 100
A6		H		0,3	43,1	>10 ³
A9		H		0,5	735,8	90 ± 10
A10		H		0,2	1890,0	>10 ³
D4				302,8	190,0	850 ± 50
D5				947,7	1680,0	400 ± 100

^a BLU = Boeringer light units

Die Ergebnisse in Tabelle 38 zeigen, dass sowohl einige SPOTs, die auf der Zellulose- und der PP-Membran als mAk TAB-2 bindend identifiziert wurden, eine Konkurrenz im ELISA-Experiment mit dem Epitop (VVSHFNDPCDSHTQFAF) aufweisen. Drei (**A6**, **D4** und **D5**) der sechs Verbindungen lieferten die gleichen Ergebnisse auf beiden planaren Oberflächen, die mit den Ergebnissen der ELISA-Experimente im Einklang stehen. Die SPOTs **A9** und **A10** zeigten eine Bindung des mAk TAB-2 an der PP-Membran, wobei die Ergebnisse an der Zellulose auf eine schlechtere Produktqualität zurückzuführen sind (vgl.

Kapitel 2.4.2). Von diesen beiden Verbindungen zeigte **A9** die beste Konkurrenz mit dem Epitop in allen ELISA-Experimenten mit einem IC_{50} Wert von 90 ± 10 μmol . Die Verbindung des SPOTs **A1**, die nur an der Zellulosemembran eine Bindung zum Antikörper zeigte, koordinierende ebenfalls an das Paratop des mAk TAB-2. Die hydrophobe Verbindung **A1** kann durch Wechselwirkungen mit der ebenfalls hydrophoben PP-Membran für dem mAk TAB-2 an dieser Membran schlechter zugänglich sein. Das würde das Ausbleiben einer Bindung von TAB-2 an **A1** dem SPOT der PP-Membran erklären. Auf eine weitere Optimierung der Bindung der [1,3,5]-Triazinderivate, durch Einsatz von weiteren Aminen oder Phenolen zur Chlorsubstitution wurde aus Zeitgründen verzichtet.

Zusammenfassend konnten durch die Bindungsstudien an *de novo* [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken einige Bindungspartner für den mAk-TAB-2 identifiziert werden. Untersuchungen zur Verwendbarkeit der planaren Oberfläche haben ergeben, dass sich Bindungsstudien mit dem Antikörper TAB-2 und [1,3,5]-Triazinen sowohl an der Zellulosemembran als auch an der modifizierten PP-Membran durchführen lassen. Abgesehen von der synthetischen Zugänglichkeit der Verbindungen stimmten die Bindungsstudien an beiden Membranen mit den [1,3,5]-Triazinen und dem mAk TAB-2 tendenziell überein. In nachfolgenden ELISA-Experimenten konnte gezeigt werden, dass sechs der zuvor an den planaren Oberflächen identifizierten Bindungspartner (**18-6-19** und **6-3-1** aus Tabelle 37 sowie **A1**, **A9**, **D4** und **D5** aus Tabelle 38) mit dem Epitop des Antikörpers konkurrieren und somit mit hoher Wahrscheinlichkeit am Paratop des Antikörpers binden.

4.2 Lösliche [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken in einem Agardiffusions-Assay

Als Modell für das Screening in Lösung diente ein Agardiffusions-Assay mit einer modifizierten Hefe, die einen Somatostatin-Rezeptor enthält. Bislang sind fünf humane Somatostatin-Rezeptor Subtypen bekannt (hSSTR1-5).^[146] Diese Rezeptoren sind an vielen Prozessen wie etwa bei der Ausschüttung von Glukagon und Insulin, bei der Muskelkontraktion und der Neurotransmission beteiligt. Der hier eingesetzte Subtyp war der, dem humanen homologe, Ratten-SSTR2-Rezeptor. Der agonistische Ligand zu dem SSTR2 ist das Peptidhormon Somatostatin S14, welches von Brazeau *et al.* aus 500000 Schafs-Hypothalami isoliert wurde.^[147] S14 ist ein disulfidverbrücktes 14-meres Peptid (Abb. 29) mit inhibitorischer Wirkung bzgl. der Sekretion von Hormonen, wie etwa dem Wachstumshormon der Hypophyse, Glukagon und Insulin.

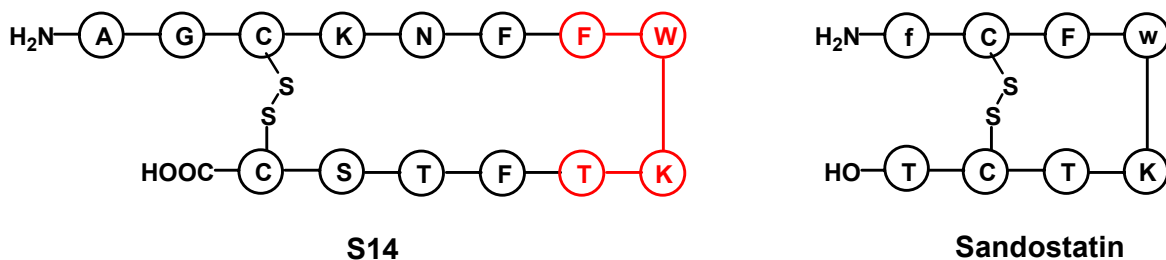


Abb. 29: Primärstruktur von S14 und dem Derivat Sandostatin®. Im Gegensatz zu S14 enthält Sandostatin® D-Aminosäuren und trägt C-terminal einen Alkohol. Die Schlüsselpositionen für die Aktivität von S14 sind rot hervorgehoben.

Im Gegensatz zu Bindungsstudien handelt es sich bei dem Agardiffusions-Assay um ein funktionelles Assay, in dem die Testsubstanzen in gelöster Form eingesetzt werden und ggf.

zu einer Vermehrung der Hefezellen führen. Die Hefe tragen den rSSTR2-Rezeptor, so dass bei Zugabe des Agonisten S14 eine Signalkaskade aktiviert wird, was nicht nur zu einer Vermehrung der Hefe führt, sondern es auch zu einer Bildung von LacZ kommt (Abb. 30a). Die Expression von LacZ konnte, durch die Zugabe von 5-Chlor-4-Brom-3-indolyl- β -D-galactosid (X-GAL) ins Medium, das zu einem Indigoderivat umgesetzt wird, über eine Blaufärbung sichtbar gemacht werden. Der Radius der Blaufärbung sowie deren Intensität ist proportional zu der Menge an zugegebenen Agonist S14 (Abb. 30b).

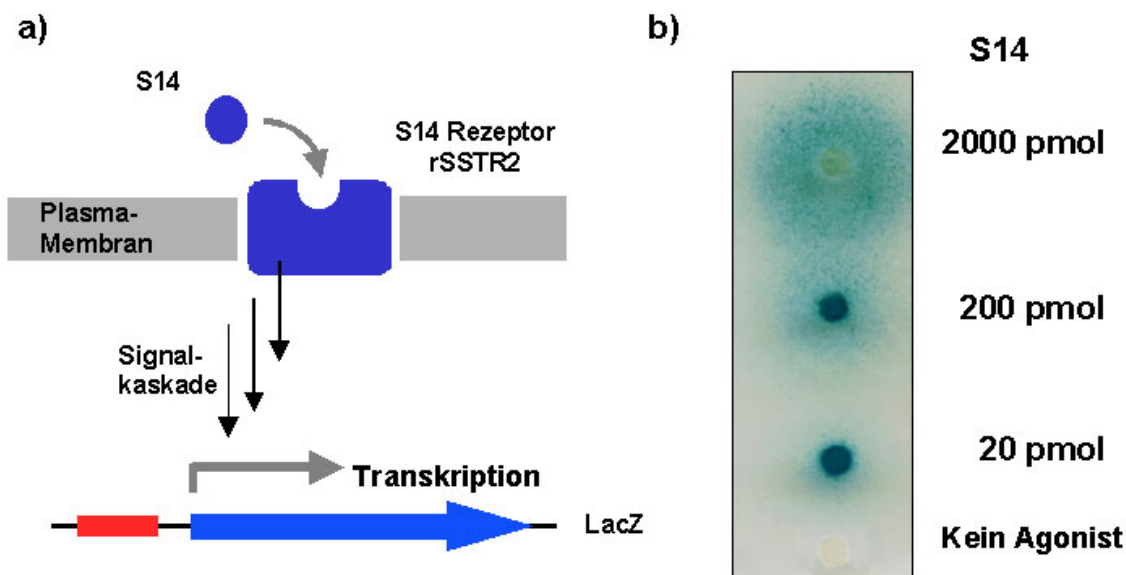


Abb. 30: Prinzip des Assays; a) Zugabe von S14 zur modifizierten Hefe löst eine Signalkaskade aus und LacZ wird gebildet, das im Nähragar mit X-Gal durch eine Blaufärbung nachgewiesen wird. Die Menge an zugegebenen S14 ist proportional zum Radius der Blaufärbung (b).

Die Sensitivität des Assays zeigt, dass noch 20 pmol von S14 eine ausreichende Expression von LacZ bewirken, um ein deutliches Signal zu erhalten. Da ein SPOT ca. 10-50 nmol an gewünschtem Syntheseprodukt enthält, sollten selbst schwache Agonisten mit einem Tausenstel der Aktivität von S14 noch detektierbar sein. Zur Durchführung des Screenings wurden flache Schalen mit einem Gemisch aus modifizierten Hefen, Nähragar und X-Gal beschichtet. Anschliessend wurden die SPOTs mit den adhäsiv gebundenen Testsubstanzen aufgelegt. Nach drei Tagen bei 37°C zeigten gewachsene Hefekolonien und eine Blaufärbung die agonistische Aktivität einiger Verbindungen an (Abb. 31).

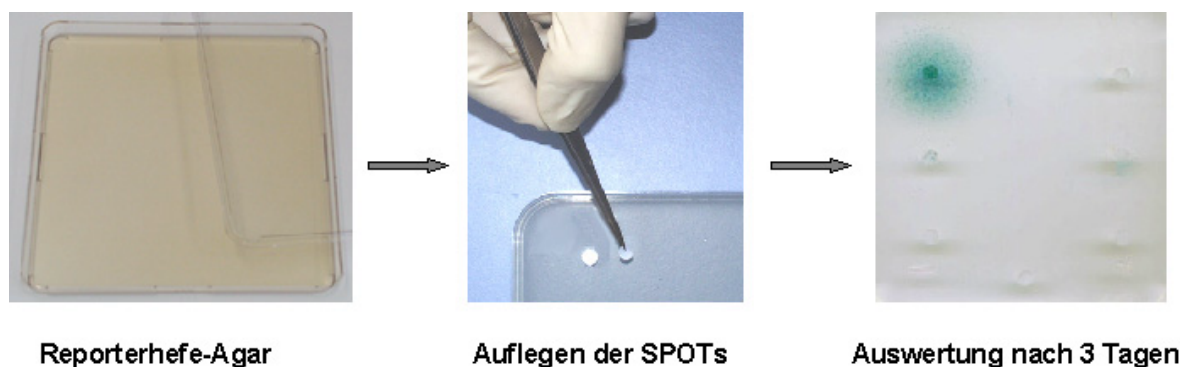


Abb. 31: Durchführung des Agardiffusions-Assays mit ausgestanzten SPOTs und Auswertung nach drei Tagen.

S14 besitzt nur eine sehr geringe Stabilität im humanen Serum, und kann daher weder zu Therapie- noch zu Diagnostikzwecken eingesetzt werden.^[148] Das Analogon Octreotid (Sandostatin®; Abb. 29) wird aufgrund der biologischen Verfügbarkeit und Stabilität im Blutkreislauf^[149] sowohl zur Diagnostik^[74, 150] als auch in besonderen Fällen zur Tumorbekämpfung^[151] eingesetzt. Die weiten Indikationsbereiche von Somatostatin-Analoga waren und sind Anlass zur Entwicklung immer neuer Verbindungen mit verbesserter Serumstabilität, Rezeptorspezifität oder sogar oraler Verfügbarkeit.^[73, 152-159]

Eine Disulfidbindung stabilisiert zwar einige Konformationen im S14, jedoch ist sie nicht vollständig serumstabil. Ein Ansatz zur Modifikation des S14 hinsichtlich besserer Serumstabilität ist der Austausch der Disulfidbrücke gegen andere Strukturelemente wie z.B. Lanthionine^[156] oder Amid-Gruppen.^[152]

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der Austausch der Disulfidbrücke gegen eine 2,4-Diamino-[1,3,5]-triazineinheit (Abb. 32) eine weitere Methode zur Darstellung von biologisch aktiven S14-Analoga bietet.

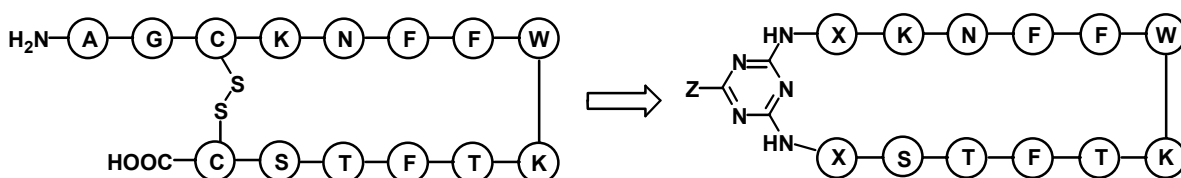


Abb. 32: Austausch der Disulfidbrücke im S14 gegen eine 2,4-Diamino-[1,3,5]-triazineinheit.

Zusätzlich zu der Stabilisierung, die durch den Ersatz der Disulfidbrücke durch ein heteroaromatisches System erreicht wird, eröffnet sich eine weitere Möglichkeit. Das nach erfolgtem Ringschluss verbleibende Chloratom am [1,3,5]-Triazinring kann gegen spezielle Reste (Z in Abb. 32) ausgetauscht werden, um so eventuell eine höhere Aktivität zu generieren oder eine Rezeptorspezifität für den SSTR2 zu erreichen.

Im Gegensatz zu der *de novo* Bibliothek im Fall von TAB-2, sollte hier ein bekanntes Peptid in ein Peptidmimetikum mit ähnlicher Aktivität transformiert werden. Im Rahmen der Transformation wurde das C-terminale Cystein gegen ein Lysin mit Mtt-Schutzgruppe an der ϵ -Aminogruppe ausgetauscht. Um Nebenreaktionen mit der freien Mercaptogruppe des zweiten Cysteins zu vermeiden, wurde dieses durch eine Aminosäure mit ähnlicher Raumerfüllung (Aminobuttersäure; Abu) ersetzt. Der Einfluss der [1,3,5]-Triazineinheit auf die biologische Wirkung der S14-Derivate war nicht bekannt, deswegen wurden zur Kontrolle nicht nur die cyclischen Verbindungen (Abb. 33 C) synthetisiert, sondern auch die lineare Sequenz mit acetyliertem N-Terminus (Abb. 33 A) und mit einem Triazinylrest am N-Terminus (Abb. 33 B). Als Linker wurde der Ester-Linker gewählt, da so grössere Substanzmengen pro SPOT erreichbar sind als beispielsweise mit dem Photolinker.

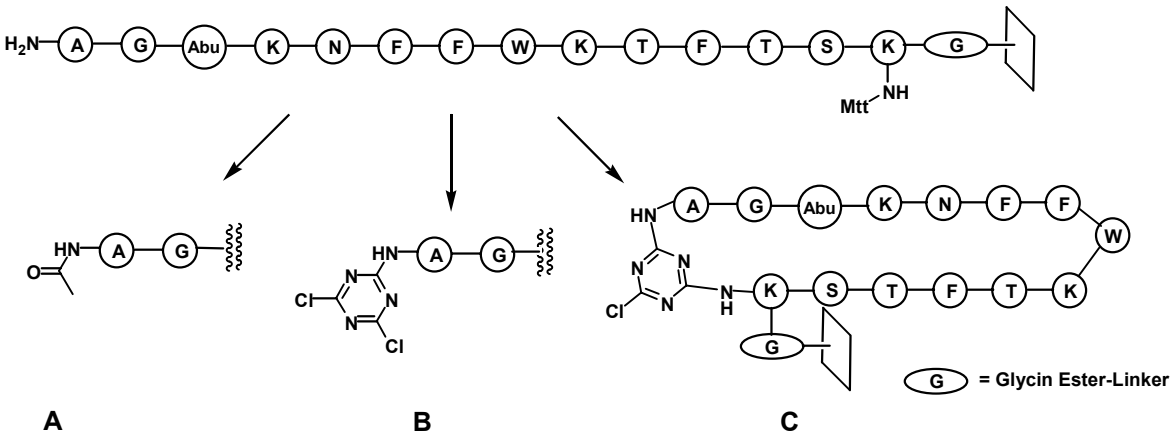


Abb. 33: Ansatz zur Transformation von S14 und zusätzliche lineare Kontrollen **A** und **B** der cyclischen Verbindungen **C** für das Assay.

Neben dem Austausch der Disulfidbrücke sollte ferner die Ursprungspeptidsequenz systematisch verkürzt werden. Durch eine schrittweise Verkürzung können wichtige Schlüsselpositionen in der Sequenz detektiert werden, da nach deren Entfernen der entsprechenden Aminosäure(n) die agonistische Wirkung der Verbindungen im Screening verloren geht. Eine solche Verkürzung kann auf viele verschiedene Arten erfolgen: Entfernen einzelner oder mehrerer Aminosäuren vom *N*- oder *C*-Terminus, gleichzeitige Verkürzungen vom Kopf und Ende sowie aus der Mitte, um nur einige Beispiele zu nennen. Hier wurde die getrennte Verkürzung der Ausgangssequenz vom *C*- und vom *N*-Terminus gewählt. Die verkürzten Sequenzen sind in Tabelle 39 zusammengestellt. Dabei entspricht die Sequenz mit den Nummern 1-12 der Ursprungssequenz, die ersten 11 Sequenzen der Verkürzungen von *N*-Terminus und die Nummern 13-23 der Verkürzungen von *C*-Terminus, wobei das *C*-terminale Lysin jedoch als Cyclisierungsanker konstant gehalten wurde.

Tabelle 39: Peptidsequenzen für den ersten Transformationsschritt von S14.

Sequenz														
1-1											T	S	K*	
1-2										F	T	S	K*	
1-3									T	F	T	S	K*	
1-4								K	T	F	T	S	K*	
1-5						W	K	T	F	T	S	K*		
1-6					F	W	K	T	F	T	S	K*		
1-7				F	F	W	K	T	F	T	S	K*		
1-8			N	F	F	W	K	T	F	T	S	K*		
1-9			K	N	F	F	W	K	T	F	T	S	K*	
1-10		Abu	K	N	F	F	W	K	T	F	T	S	K*	
1-11		G	Abu	K	N	F	F	W	K	T	F	T	S	K*
1-12	A	G	Abu	K	N	F	F	W	K	T	F	T	S	K*

Fortsetzung Tabelle 39

Nr.		Sequenz											
1-13	A	G	Abu	K	N	F	F	W	K	T	F	T	K*
1-14	A	G	Abu	K	N	F	F	W	K	T	F		K*
1-15	A	G	Abu	K	N	F	F	W	K	T	K*		
1-16	A	G	Abu	K	N	F	F	W	K	K*			
1-17	A	G	Abu	K	N	F	F	W	K*				
1-18	A	G	Abu	K	N	F	F	K*					
1-19	A	G	Abu	K	N	F	K*						
1-20	A	G	Abu	K	N	K*							
1-21	A	G	Abu	K	K*								
1-22	A	G	Abu	K*									
1-23	A	G	K*										

K* = Lys (Mtt)

Die Synthese der maximal 14-meren Peptide erfolgte in drei Replika auf einer Zellulosemembran. Neben den beiden linearen Verbindungen (vgl. Abb. 33 **A** und **B**) wurden an der planaren Oberfläche die cyclischen Peptidmimetika (Abb. 33 **C**) dargestellt, wobei von einigen ausgewählten Verbindungen eine zusätzliche Kopie für die Analytik synthetisiert wurde. Die Synthese der Peptidsequenzen erfolgte an einem Glycin-Esterlinker mit den jeweiligen Pentafluorphenylester der Aminosäuren. Zur Gasphasen-Abspaltung der Verbindungen von der Zellulose wurde Methylamin verwendet, da es parallel zur Ester-spaltung im Verlauf von 14 Stunden in der Lage ist alle an den [1,3,5]-Triazinderivaten verbliebenen Chloratome zu substituieren (vgl. Kapitel 2.2.1). Anhaftendes überschüssiges Amin wurde anschliessend im Vakuum entfernt und die ausgestanzten SPOTs auf das Agar-Hefezellen-Gemisch gelegt (Abb. 34). Die Nummern 1 bis 12 und 13 bis 23 über den Spalten der SPOTs entsprechen den Sequenznummern in Tabelle 39. Die Zeilen **A** repräsentieren die linearen Peptide mit acetyliertem *N*-Terminus, **B** enthalten SPOTs mit linearen Peptide-Triazinderivaten und **C** die SPOTs mit den cyclischen Peptidmimetika. Als Positivkontrolle des Testsystems wurden mit S14 getränkte SPOTs verwendet.

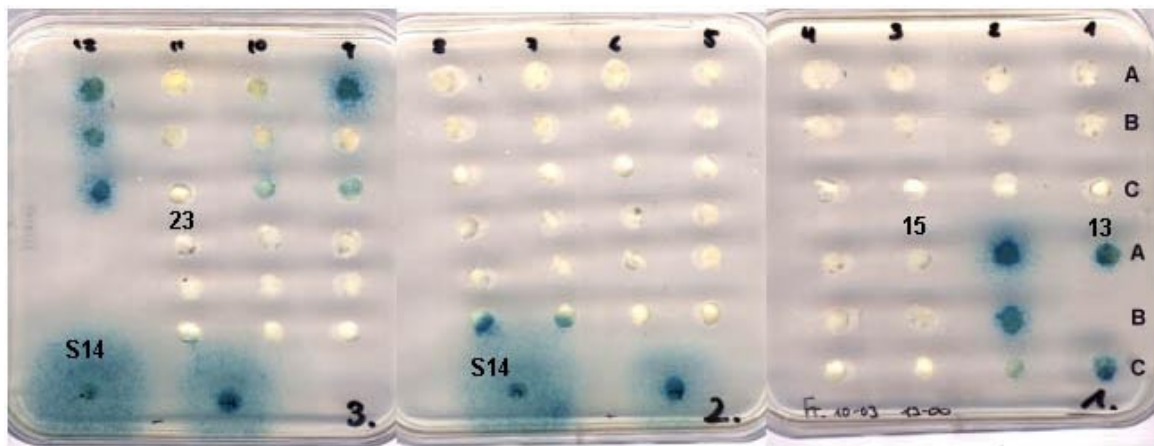


Abb. 34: Ergebnis des ersten Screenings mit cyclischen Peptid-Triazinderivaten; eine Blaufärbung zeigt aktive Verbindungen auf den SPOTs an.

Nach drei Tagen bei 37°C zeigten sich erste Resultate (Abb. 34). Insgesamt wiesen elf Verbindungen der SPOTs eine agonistische Aktivität zu dem rSSTR2-Rezeptor auf, wobei einige Sequenzen sowohl die linearen als auch die cyclischen Derivate biologisch aktiv waren. Für die nachfolgende Untersuchung zur weiteren Verkürzung der Peptidsequenz wurden zwei SPOTs ausgewählt; **1-10C** (cyclo-AbuKNFFWKTFTSK*G; Abb. 34 dritte Zeile, dritter SPOT von links) und **1-13C** (cyclo-AGAbuKNFFWKTFTK*G; Abb. 34 sechste Zeile, erster SPOT von rechts). Zwar zeigte **1-9C** ebenfalls eine agonistische Wirkung im Assay, jedoch war hier auch die lineare, acetylierte Verbindung **1-9A** aktiv. Es bestand die Möglichkeit, dass die beobachtete agonistische Aktivität auf Spuren einer Verunreinigung durch das lineare Peptid beruht. Die Verkürzung der beiden Peptidsequenzen erfolgte in nächsten Schritt von der jeweils entgegengesetzten Seite; die Sequenz von **1-10C** wurde vom C-Terminus, die von **1-13C** vom N-Terminus verkürzt (Tabelle 40). Als Kontrolle der vorangegangenen Ergebnisse wurde **1-10C** und **1-13C** erneut synthetisiert und getestet (vgl. **2-10** und **2-11**).

Tabelle 40: Peptidsequenzen für den zweiten Transformationsschritt von S14.

Nr.		Sequenz											
2-1	Abu	K	K*										
2-2	Abu	K	N	K*									
2-3	Abu	K	N	F	K*								
2-4	Abu	K	N	F	F	K*							
2-5	Abu	K	N	F	F	W	K*						
2-6	Abu	K	N	F	F	W	K	K*					
2-7	Abu	K	N	F	F	W	K	T	K*				
2-8	Abu	K	N	F	F	W	K	T	F	K*			
2-9	Abu	K	N	F	F	W	K	T	F	T	K*		
2-10	Abu	K	N	F	F	W	K	T	F	T	S	K*	
2-11	A	G	Abu	K	N	F	F	W	K	T	F	T	K*

Fortsetzung Tabelle 40

Nr.	Sequenz											
2-12	G	Abu	K	N	F	F	W	K	T	F	T	K*
2-13		Abu	K	N	F	F	W	K	T	F	T	K*
2-14			K	N	F	F	W	K	T	F	T	K*
2-15				N	F	F	W	K	T	F	T	K*
2-16					F	F	W	K	T	F	T	K*
2-17						F	W	K	T	F	T	K*
2-18							W	K	T	F	T	K*
2-19								K	T	F	T	K*
2-20									T	F	T	K*
2-21										F	T	K*

K* = Lys(Mtt)

Die Durchführung der Synthesen und des Screenings erfolgte in Analogie zum ersten Transformationsschritt. Hierbei konnten im Assay die cyclischen Triazinderivate mit den Peptidsequenzen AbuKNFFWKTFKG (**2-8C**) und NFFWKTFTKG (**2-15C**) als kleinste Agonisten detektiert werden. Die kürzere der beiden Sequenzen (**2-15C**) wurde gewählt, um eine weitere Verkleinerung des Peptidmimetikums zu untersuchen.

Nach der Verkürzungen der Sequenz vom *N*- und *C*-Terminus folgte in dem dritten Transformationsschritt ein systematisches Entfernen jeweils einer Aminosäure in der verbliebenen Sequenz **2-15**. Die Synthese erfolgte unter den selben Bedingungen wie zuvor. Die Ausgangssequenz **2-15** wurde als Kontrolle erneut synthetisiert und getestet. Die Sequenzen sind in Tabelle 41 gezeigt.

Tabelle 41: Peptidsequenzen für den dritten Transformationsschritt von S14.

Nr.	Sequenz								
3-1	N	F	F	W	K	T	F	T	K*
3-2	N	F	F	W	K	T	F	-	K*
3-3	N	F	F	W	K	T	-	T	K*
3-4	N	F	F	W	K	-	F	T	K*
3-5	N	F	F	W	-	T	F	T	K*
3-6	N	F	F	-	K	T	F	T	K*
3-7	N	F	-	W	K	T	F	T	K*
3-8	-	F	F	W	K	T	F	T	K*

K* = Lys(Mtt)

Das Screening der Verbindungen zeigte eine deutliche agonistische Aktivität der cyclischen Verbindungen **3-1C** und **3-2C**. Aus diesem Ergebnis lässt sich ableiten, dass aus der Mitte und vom *N*-Terminus der Sequenz keine Aminosäuren entfernt werden können, ohne dass die Aktivität im Screening-Assay verloren geht. Dieses Resultat steht im Einklang mit Literaturdaten, über die Beschreibung der Schlüsselpositionen (speziell die Aminosäuren F-W-K-T-F) im S14.^[73, 146, 155, 160] Dennoch besteht die Möglichkeit, dass sich aus der kürzesten Sequenz **3-2** eine oder sogar mehrere Aminosäuren entfernen lassen, ohne dass die biologische Aktivität vollständig verloren geht. Eine weitere Verkürzung der Sequenz **3-2** wurde in dem vierten Transformationsschritt durchgeführt (Tabelle 42).

Tabelle 42: Peptidsequenzen für den vierten Transformationsschritt von S14.

Nr.		Sequenz						
4-1	N	F	F	W	K	T	F	K*
4-2	N	F	F	W	K	T	-	K*
4-3	N	F	F	W	K	-	F	K*
4-4	N	F	F	W	-	T	F	K*
4-5	N	F	F	-	K	T	F	K*
4-6	N	F	-	W	K	T	F	K*
4-7	-	F	F	W	K	T	F	K*

K* = Lys(Mtt)

Die Sequenzen wurden, wie in den vorangegangenen Untersuchungen auf einer Zellulosemembran am Glycin-Esterlinker in drei Replika synthetisiert. Die linearen Verbindungen ohne (**A**) und mit *N*-terminalem Triazinring (**B**), als auch die cyclischen Peptidmimetika wurden im Assay getestet. Zur Kontrolle der Synthesequalität wurden erneut von einigen Sequenzen Replika für analytische Zwecke angefertigt. Die Ergebnisse des Assays zeigten, dass lediglich die cyclische Verbindung **4-1C**, die aus dem vorangegangenen Test (vgl. **3-2C**) ausgewählt wurde, agonistische Aktivität besass (Abb. 35).

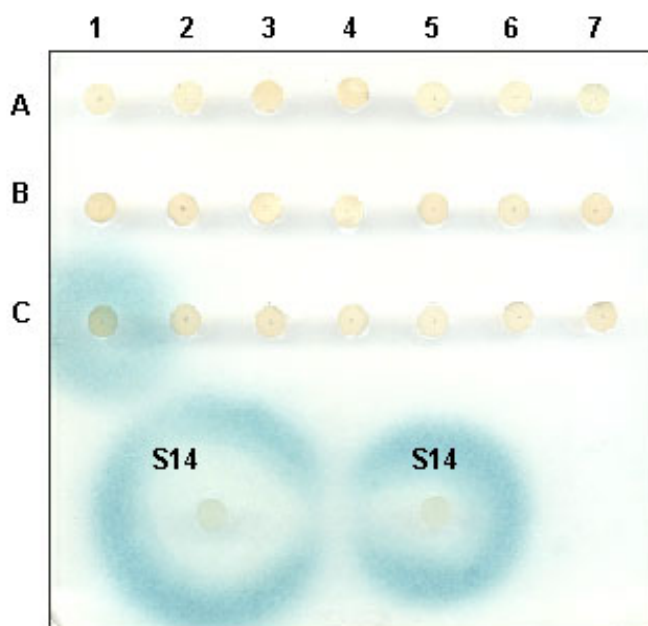


Abb. 35: Screening der Substanzen nach der letzten Verkürzung der Peptidsequenz. Nur die cyclische „Ausgangssequenz“ zeigte, neben den Kontrollen, eine agonistische Aktivität.

Die Aktivitätsabnahme war nicht auf geringere Substanzmengen bzw. Reinheit zurückzuführen. So waren Menge und Reinheit von **4-1C** und z.B. **4-4C** auf den jeweiligen SPOTs nahezu gleich, wie eine HPLC-MS Analytik der zusätzlichen Replika zeigte (Abb. 36).

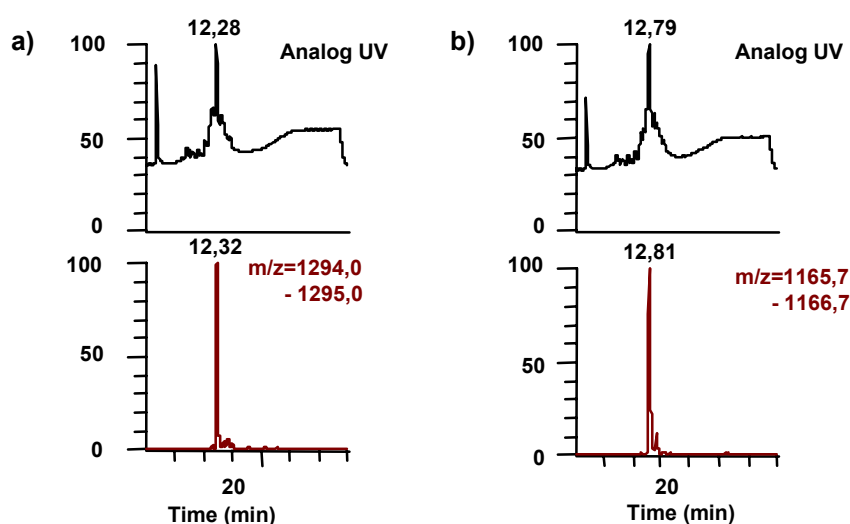


Abb. 36: HPLC-MS Analytik von **4-1C** (a) und **4-4C** (b); gezeigt sind die UV-Spur bei 220 nm (oben) und der entsprechende Massenbereich der Zielverbindung (unten).

Das Ergebnis des Screenings bzgl. der Aktivität von z.B. **4-4C** stimmt mit den bekannten Schlüsselpositionen für biologische Aktivität im S14 überein.^[146, 148, 155, 160] Als Vergleich sind die bekannten Schlüsselpositionen des S14 (vgl. Abb. 29) in dem hier gefundenen kleinsten aktiven Cyclus dargestellt (Abb. 37).

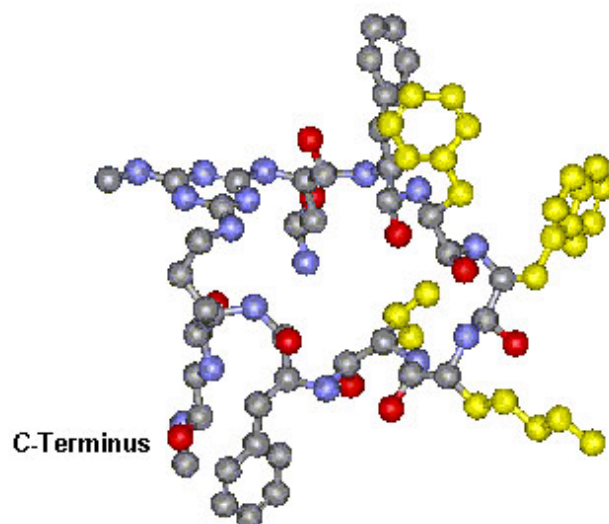


Abb. 37: *Kleinster aktiver SSTR2-Agonist 4-1C aus der Transformation von S14. Die im S14 bekannten Schlüsselpositionen sind gelb hervorgehoben.*

Insgesamt konnte durch Austausch der Disulfidbrücke und sukzessive Verkürzung der Peptidsequenz das 14-mere Peptid S14 mit einem Molekulargewicht von 1635 g/mol in das 9-mere Peptidmimetikum **4-1C** mit einem Molgewicht von 1293 g/mol systematisch transformiert werden. Das Molekulargewicht von **4-1C** liegt zwar nicht im optimalen Bereich für pharmakologische Wirkstoffe (< 650 g/mol),^[55, 67] aber durch den Ersatz der Disulfidbindung gegen den [1,3,5]-Triazinring besteht die Möglichkeit einer erhöhten Proteolysestabilität.

Im Rahmen dieser Arbeit ist eine vollständige Transformation vom agonistischen Peptid S14 in eine potentielle Leitstruktur nicht möglich. Die Screeningergebnisse zeigten jedoch eine signifikante Aktivität der Verbindung **4-1C**. Durch Variation der Reste am [1,3,5]-Triazinring nach erfolgtem Ringschluss und Austausch einzelner Aminosäurebausteine z. B. gegen Peptoidbausteine besteht die Aussicht die Aktivität dieser Verbindung zu steigern. Somit könnte die Verbindung **4-1C** als neuer Ansatzpunkt für die Entwicklung von Leitstrukturen für die Findung neuer SSTR2-Agonisten betrachtet werden.

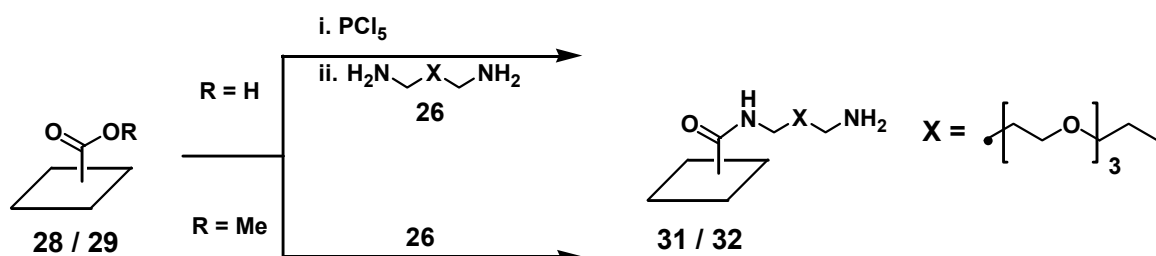
5 Zusammenfassung und Ausblick

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, das Anwendungsgebiet der SPOT-Synthese von Peptiden auf [1,3,5]-Triazine auszudehnen und diese in biologischen Tests zu untersuchen. Es ist gelungen, mit einer funktionalisierten PP-Membran eine weitere planare Oberfläche für die SPOT-Synthese nutzbar zu machen, und diese neben einer derivatisierten Zellulosemembran für die Darstellung von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken mit anschließendem Festphasen-Screening einzusetzen. Die Etablierung geeigneter Linkersysteme ermöglichte die Erarbeitung und Optimierung von Synthesebedingungen für die Zielbibliotheken an planaren Oberflächen. Es gelang Bedingungen für eine Immobilisierung von Cyanurchlorid an Aminogruppen der Linker, Peptide, Peptomeren oder Peptoiden zu finden. Die gewünschten Bibliotheken waren sowohl durch intermolekulare Reaktion von immobilisierten 4,6-Dichlor-[1,3,5]-triazinen mit Aminen oder Phenolaten als auch durch intramolekulare Reaktion mit weiteren Aminogruppen in dem jeweiligen Oligomer zugänglich. Die mittels SPOT-Synthese erhaltenen Triazinderivate lieferten sowohl im Festphasen-Screening als auch im Screening in Lösung neue, biologisch aktive Substanzen.

Die Ergebnisse des schrittweisen Vorgehens sind nachfolgend aufgeführt:

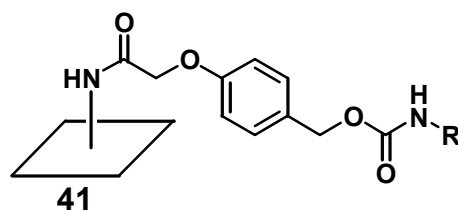
(1) Membranderivatisierung und Linkersysteme

Zellulosemembranen erwiesen sich bereits als gut geeignete Träger für die SPOT-Synthese von Peptiden. Bei einer Erweiterung des Repertoires an Verbindungen, die mittels SPOT-Synthese zugänglich sind, können die Hydroxylgruppen der Zellulose die Möglichkeiten der durchführbaren Syntheseoperationen jedoch einschränken. Um diese etwaige Limitation durch die Beschaffenheit der Oberfläche zu vermeiden wurden bereitgestellte acrylsäure- und acrylsäuremethylesterfunktionalisierte PP-Membranen im Rahmen dieser Arbeit für die SPOT-Synthese derivatisiert. Es konnte eine Aminofunktionalisierung der PP-Membran erreicht werden, die die Anforderungen der SPOT-Synthese hinsichtlich Derivatisierungsgrad und Homogenität erfüllt. Dies gelang durch Umsatz der carbonsäurefunktionalisierten Membran **28** mit Phosphorpentachlorid zum entsprechenden Säurechlorid und anschließender Reaktion mit 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin **26**. Die carbonsäuremethylesterfunktionalisierte Membran **29** konnte direkt durch Umsatz mit **26** in die entsprechende aminoderivatisierte Membran **32** überführt werden (Schema 45).



Schema 45: Aminoderivatisierung der PP-Membranen.

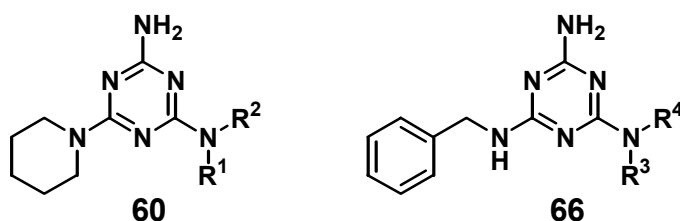
Neben den bereits an der Zellulosemembran verwendeten Photo- **51** und Rink-Linker- **37** Derivatisierungen konnten mit dem Carbamatlinker **41** derivatisierte PP-Membranen für eine Erhöhung der Diversität der [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken eingesetzt werden.



(2) Synthesen von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken durch *intermolekulare* S_NAr am Cyanurchlorid unter SPOT-Bedingungen

An die Derivatisierung der PP-Membran und der Anbringung unterschiedlicher Linkersysteme schloss sich die Immobilisierung des Cyanurchlorids an. Dies gelang durch die Inkubation der planaren Oberflächen in einer 2 M Lösung von Cyanurchlorid in DCM, wobei im Fall der PP-Membran ein Zusatz von 10 % DIEA (v/v) notwendig war. Hierbei zeigte sich, dass die Art der Aminoderivatisierung, also ob es sich um die Aminogruppe eines Linkers, einer Aminosäure oder eines Peptoids handelte, keinen Einfluss auf die Vollständigkeit der Reaktion besass.

Die Kernaufgabe der folgenden Untersuchungen bestand in der Bestimmung der Reaktionszeit, die notwendig war, um selektiv eines der verbliebenen Chloratome durch Nucleophile zu substituieren. Dieses Ziel konnte mit einer Reaktionszeit von 30 min für viele unterschiedliche Amine erreicht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 84 Amine bezüglich dieser Monochlorsubstitution unter SPOT-Synthese-Bedingungen an den Modellen **60** bzw. **66** untersucht, wobei 70 Amine einen Umsatz von mindestens 80 % zeigten. Zwischen den beiden planaren Oberflächen zeigten sich lediglich geringe Unterschiede bzgl. Umsatz und Reinheit der Verbindungen zu Gunsten der PP-Membran.



Bei Untersuchungen zur Substitution an Dichlor-[1,3,5]-triazinderivaten durch O-Nucleophile zeigte lediglich die Gruppe der Phenolate ausreichende Umsätze. Bei den zwölf verwendeten Phenolaten kam es bei fünf Derivaten an der PP-Membran zu Umsätzen von mindestens 80 %. An der Zellulosemembran zeigte lediglich Phenol 80 % Umsatz, alle anderen Tests verliefen mit geringeren Umsätzen.

Für die Substitution des letzten Chloratoms am [1,3,5]-Triazinring konnte Mikrowellenbestrahlung als Energiequelle erfolgreich eingesetzt werden. Diese Art des Energietransfers zeigte sich für die SPOT-Synthese als gut geeignet. So konnten bei 38 der 46 untersuchten Amine Umsätze von ≥ 80 % erreicht werden. Einen signifikanten Unterschied zwischen der Zellulose- und der PP-Membran gab es bei den Aminen nicht. Mit Hilfe der Mikrowellenbestrahlung gelang es bei sechs der Phenolate an der Zellulose und zehn der insgesamt zwölf Phenolate an der PP-Membran Umsätze von ≥ 80 % zu erzielen und so Reaktivitätsunterschiede an den planaren Oberflächen anzugleichen.

Mit Hilfe der im Anschluss durchgeführten Synthesen von Peptomer-Triazin- und Peptid-Triazin-Bibliotheken konnte eine Automatisierbarkeit der Darstellungen demonstriert werden. Für die Synthese von diversen [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken steht somit ein modulares System zur Verfügung bei dem verschiedene Bausteine miteinander kombiniert werden können (Abb. 38).

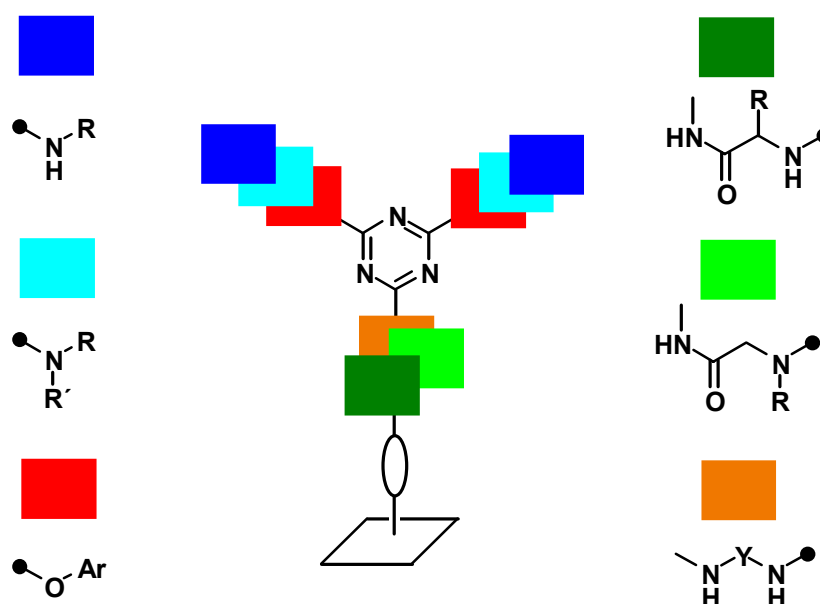


Abb. 38: Modulares System bei der Synthese von diversen [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken.

(3) Synthesen von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken durch *intramolekulare* S_NAr an 2,4-Dichlor-[1,3,5]-triazinderivaten unter SPOT-Bedingungen

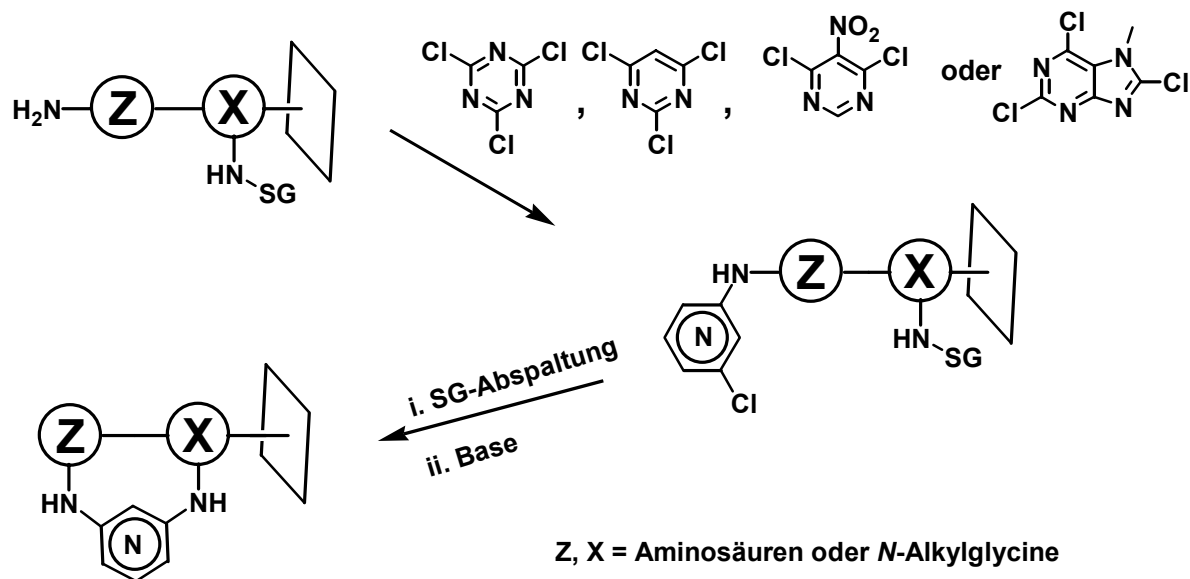
Nach den erfolgreichen Synthesen der [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken durch intermolekulare Substitution konnte der Anwendungsbereich von Cyanurchlorid für die Synthesen cyclischer Peptidmimetika erweitert werden. Es gelang, die jeweiligen linearen Oligomere mit mindestens zwei Aminogruppen, durch schrittweise Substitution der Chloratome am Cyanurchlorid zu cyclisieren.

Als Modellpeptid wurde das Dekapeptid GAFGAFGAFK gewählt, Cyanurchlorid am *N*-Terminus immobilisiert und nach Entschützung die Aminogruppe der Lysinseitenkette für die Substitution des nächsten Chloratoms am Dichlor-[1,3,5]-triazinrest eingesetzt. Es wurden unterschiedliche Ringgrößen durch einen Lysin-Scan und durch die schrittweise Verkürzung der Peptidsequenz beginnend vom *N*-Terminus synthetisiert. Hierbei wurde gefunden, dass sich Makrocyclen mit einer Größe von 13 bis 37 Ringatomen in sehr guten Reinheiten erhalten lassen. Mittels Einbau von nicht-natürlichen Aminosäuren mit verkürzter Alkylkette an der Aminoseitenkette konnte eine minimal erreichbare Ringgröße von elf Atomen bestimmt werden. Untersuchungen zur Kompatibilität der Cyclisierungsmethode mit den proteinogenen Aminosäuren an den Modellen Ala-Xxx-Lys und Xxx-Phe-Lys ergaben, dass die 19 verwendeten Aminosäuren sich erfolgreich in der Cyclisierung vom jeweiligen *N*-Terminus zur Seitenkette des Lysins einsetzen liessen. Der Ringschluss durch nucleophile Substitution kann jedoch auch im Sinne einer „Seitenkette-zu-Seitenkette“-Cyclisierung erfolgen, falls das Cyanurchlorid nicht am *N*-Terminus, sondern an einer Lysinseitenkette immobilisiert wurde. Dies konnte anhand der Peptide Ac-Lys-Lys, Ac-Lys-Phe-Lys und Ac-Lys-Ala-Phe-Lys gezeigt werden. Die nach der Cyclisierung verbliebenen Chloratome am Triazinring konnten in Analogie zu den „linearen“ Derivaten durch verschiedene Nucleophile unter Mikrowellenbestrahlung substituiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ferner Peptomere und Peptoide als lineare Vorläufer für die Cyclisierung eingesetzt. Im Fall des Peptomere wurden *C*-terminal Peptoidbausteine mit unterschiedlich langer Aminoalkylkette eingesetzt und gefunden, dass auch hier die kleinste erreichbare Ringgröße elf Atome umfasste. Bei den trimeren Peptoiden wurde der *N*-terminale Baustein variiert und in allen untersuchten Fällen sehr gute Umsätze bei der

Cyclisierung beobachtet. Diese Ergebnisse deuten auf eine allgemeine Anwendbarkeit der Cyclisierungsmethode unabhängig von der Art oder Sequenz der linearen Oligomere hin, vorausgesetzt eine minimale Ringgröße von elf Atomen wird nicht unterschritten.

Zusätzlich zum Cyanurchlorid konnten 2,4,6-Trichlorpyrimidin, 4,6-Dichlor-5-nitropyrimidin und 2,6,8-Trichlor-7-methyl-7H-purin unter Bedingungen, die mit der SPOT-Synthese kompatibel sind, an dem N-Terminus eines Modellpeptides immobilisiert werden. Ferner gelang es in allen Fällen eine intramolekulare nucleophile Substitution verbleibender Chloratome am Stickstoff-Heterocyclus durch eine Aminogruppe durchzuführen, um eine prinzipielle Anwendbarkeit zur Cyclisierung von Oligomeren durch halogenierte Heteroaromaten zu demonstrieren.



Schema 46: Variabilität in der neuen Cyclisierungsmethode; es können unterschiedliche Oligomere mit verschiedenen halogenierten Stickstoff-Aromaten umgesetzt werden.

(4) Untersuchung der [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken in verschiedenen Assayformaten

An einer aminoderivatisierten Zellulosemembran wurde eine Dipeptid-Triazin-Bibliothek bestehend aus 8000 Einzelverbindungen synthetisiert. Die Bibliothek beinhaltete alle möglichen 400 proteinogenen Dipeptide mit einem [1,3,5]-Triazinrest am N-Terminus. Um zu überprüfen, ob sich die auf diesem Weg Proteinliganden auffinden lassen, wurden die Verbindungen auf Bindung zum monoklonalen Antikörper TAB-2 untersucht. Aus den als bindend identifizierten Triazinderivaten wurden fünf ausgewählt und am Synthescharz resynthetisiert. In kompetitiven ELISA-Experimenten konnte gezeigt werden, dass drei von diesen Verbindungen am Paratop des Antikörpers binden. Die Ergebnisse des Screenings an der Zellulosemembran konnten an der PP-Membran zum größten Teil bestätigt werden. Zusätzlich wurde ein weiteres phenolatsubstituiertes Triazinderivat **A9** mit höherer Bindungsaffinität ($90 \pm 10 \mu\text{mol}$) identifiziert. Somit konnte gezeigt werden, dass auch die PP-Membran für das Festphasen-Screening mit markierten Proteinen und immobilisierten kleinen Verbindungen verwendet werden kann.

Der Einsatz in der neuen Cyclisierungsmethode konnte erfolgreich in der begonnenen Transformation des agonistischen Peptides S14 demonstriert werden. Hierbei wurde (unter anderem) die unter physiologischen Bedingungen instabile Disulfidgruppe des nativen Peptides gegen eine [1,3,5]-Triazineinheit ausgetauscht. Eine schrittweise Verkürzung der Peptidsequenz lieferte ein neun Aminosäuren enthaltenes Peptidmimetikum mit

agonistischer Aktivität (Abb. 39). Diese Verbindung kann durch Austausch der Aminosäuren im Peptidteil oder Substitution des an der Cyclisierung nicht beteiligten Chloratoms durch geeignete Amine oder Phenolate vermutlich bzgl. ihres pharmazeutischen Profils optimiert werden.

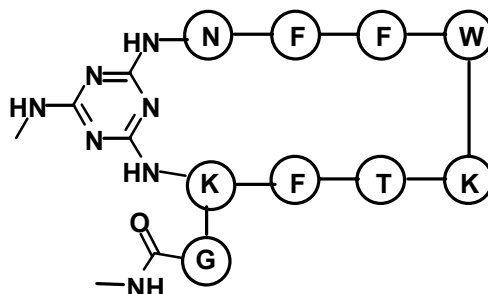


Abb. 39: Kleinster im Verlauf dieser Arbeit gefundener SSTR2-Agonist **4-1C**.

Ausblick

Mit den Synthesen der [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken auf Zellulose- und PP-Membranen konnte gezeigt werden, dass die SPOT-Synthese auch zur Darstellung von kleinen heterocyclischen Verbindungen geeignet ist. Der Einsatz der membrangebundenen Triazinderivate im Festphasen-Screening zum mAk TAB-2 zeigte ferner, dass die so erhaltenden Verbindungen geeignet sind, um biologisch aktive kleine organische Moleküle *de novo* zu identifizieren. Hieraus ergeben sich neue Möglichkeiten der parallelen Synthese und des raschen Screenings von vielen tausenden Verbindungen. Es gilt nun, nach dem 2,4,6-Trichlor-[1,3,5]-triazin, weitere Template für die Synthese von heterocyclischen Substanzbibliotheken auf planaren Oberflächen zu finden. Hierbei bieten sich die halogenierten Heteroaromaten, die bereits für die Cyclisierung von Peptiden eingesetzt wurden, an. Bindungsstudien der bereits synthetisierten [1,3,5]-Triazin-Bibliothek (oder solche die weiterer Template enthalten) mit anderen Antikörpern oder allgemein Proteinen könnten für die Findung neuer Verbindungen mit pharmakologisch interessanten Eigenschaften genutzt werden.

Die hier entwickelte Cyclisierungsmethode kann an weiteren Oligomeren wie z.B. Oligocarbamaten oder –harnstoffen untersucht werden, wobei auch zusätzliche halogenierte Heterocyklen getestet werden können.

Die Transformation des Peptides S14 in das cyclische Peptidmimetikum **4-1C** kann durch den Austausch der Aminosäuren gegen z.B. Peptide fortgeführt werden. Durch die Synthese der Peptidsequenzen am Photo-Linker kann der Einfluss des C-terminalen Glycins für die biologische Aktivität untersucht werden und so ggf. eine weitere Verkleinerung des Agonisten erreicht werden. Der Einsatz verschiedener Amine oder Phenolate zur Substitution des nach der Cyclisierung verbleibenden Chloratoms kann ebenso in die Untersuchungen mit einbezogen werden, wie die Verwendung anderer halogener Heteroaromaten. Interessant ist auch die Frage, ob die Methode der Cyclisierung bei weiteren biologisch aktiven (Cyclo-)Peptiden eingesetzt werden kann, um eine strukturelle und pharmakologische Stabilisierung zu erreichen.

6 Experimentelle Bedingungen und Durchführung

6.1 Allgemeines

Lösungsmittel

Alle verwendeten Lösungsmittel wurden in der angegebenen Qualität ohne weitere Reinigung eingesetzt:

Acetonitril (Gradient grade, J.T. Baker); Dichlormethan (zur Synthese, Merck Eurolab); Diethylether (zur Synthese, Merck Eurolab); *N,N*-Dimethylformamid (LAB, Merck Eurolab); Dioxan (zur Synthese, Aldrich); Methanol (zur Synthese, Merck Eurolab).

Wasser wurde unter Verwendung einer Vollentsalzungsanlage (Milli-Q Plus, Millipore) entmineralisiert.

Die Lösungsmittel für Reagenzien, die zur SPOT-Synthese verwendet wurden, wurden über Molsieb gelagert: *N*-Methylpyrrolidon und Dimethylsulfoxid (beide: Fluka).

Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien wurden von den Firmen Advanced ChemTech (Bamberg, Deutschland), Sigma-Aldrich-Fluka (Deisenhofen, Deutschland), Bachem (Heidelberg, Deutschland), J.T. Baker (Phillipsburg, USA), Lancaster (Mühlheim/Main, Deutschland), Merck Eurolab (Darmstadt, Deutschland), Neosystem (Strassburg, Frankreich) oder Novabiochem (Bad Soden, Deutschland) bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet. Das TentaGel-S-RAM-Harz wurde bei der Firma RAPP Polymere (Tübingen, Deutschland) bezogen.

Zur SPOT-Synthese wurden Whatman 50 Zellulosemembranen (Whatman Maidstone, UK) verwendet, die auf die benötigte Grösse zurechtgeschnitten wurden. Die PP-Membranen wurden carbonsäure- und carbonsäuremethylestermodifiziert von PolyAn GmbH (Berlin, Deutschland) erhalten.

Bei den Konzentrationen der Reagenzien in Prozent handelt es sich, wenn nicht anders angegeben, um Volumenprozent (v/v).

RP-HPLC (präparativ) erfolgte mit einem System der Firma Merck/Hitachi (Quaternäre Pumpe L-6250, Variabler UV-Detektor L-7400, Interface D-7000, Software: HPLC Systemmanager D-7000 für NT 4.0) unter Verwendung einer Säule der Firma Merck Eurolab (LiChrospher 100, RP18, 10 x 250 mm) bei einem Lösungsmittelfluss von 6,0 ml/min; Die Laufmittel-Gradienten wurden aus einem analytischen Probe-Chromatogramm abgeleitet. Das verwendete Lösungsmittelsystem setzte sich aus den Komponenten **A** (H₂O/0,1 % TFA) und **B** (CH₃CN/0,1 % TFA) zusammen.

RP-HPLC-MS-Analysen wurden durch Chromatographie unter Verwendung eines Hewlett Packard Serie 1100-Systems (Entgaser G1322A, Quaternäre Pumpe G1311A, Automatischer Probengeber G1313A, thermostatiertes Säulenfach G 1316A, Variabler UV-Detektor G1314A) und gekoppelter ESI-MS (Finnigan LCQ Ion-Trap-Massenspektrometer) durchgeführt. Dazu wurde eine Steuersoftware der Firma Finnigan verwendet (Navigator Ver 1.1 sp1). Als Stossgas in der Ionenfalle diente Helium. Die Trennung erfolgte an RP-18-Säulenmaterial (Vydac 218 TP5215, 2,1 x 150 mm, 5 µm, C18, 300 Å mit Vorsäule (Merk)) bei 30°C und einem Fluss von 0,3 ml/min unter Anwendung eines linearen

Gradienten für alle Chromatogramme (5-95 % **B** innerhalb von 25 min, wobei **A**: 0,05 % TFA in Wasser und **B**: 0,05 % TFA in CH₃CN). Die UV-Detektion erfolgte bei $\lambda = 220$ nm. Retentionszeiten (R_t) sind im Dezimalsystem angegeben (z.B. 1,9 min = 1 min 54 sec) und beziehen sich auf die Detektion im Massenspektrometer. Die Totzeit zwischen Injektion und UV-Detektion (HPLC) betrug 1,65 min, zwischen UV-Detektion und Massendetektion 0,21 min. Es wurden zwei MS-Methoden zur Identifizierung der Syntheseprodukte innerhalb eines Laufes verwendet. Bei erwarteten Massen unter 1000 erfolgte die Massenanalyse mittels einer Abfolge verschiedener Spektren-Typen: (a) Standardspektren in den Massenbereichen 50-2000 und 50-1000, (b) MS²-Spektrum des intensivsten Iones im Bereich 50-1000 mit einer Kollisionsenergie von 24 % und (c) *Collision-Induced-Dissociation*-(CID)-Spektren im Bereich 50-900 bei 35 % Kollisionsenergie. Für Produkte mit einer Masse $1000 \leq M$ bzw. bei Auffälligkeiten im 50-2000 Segment vorangegangener HPLC-MS-Läufe wurde die Massenanalyse mittels der Abfolge dieser Spektren-Typen: (a) Standardspektren in den Massenbereichen 50-2000, (b) MS²-Spektren der intensivsten Ionen im Bereich 50-2000 mit einer Kollisionsenergie von 24 %, (c) erneute MS²-Spektren des intensivsten Ionen vom vorherigen MS²-Spektrum (MS³-Spektren der ursprünglichen Ions aus (a)) mit einer Kollisionsenergie von 24 % und (d) *Collision-Induced-Dissociation*-(CID)-Spektren im Bereich 50-2000 bei 35 % Kollisionsenergie durchgeführt. Die Zuordnung der Reaktionsprodukte zu den Signalen des UV-Detektors der HPLC wurde durch Anwendung von Massenfiltern für die gesuchte(n) Masse(n) durchgeführt. Die theoretischen Massen sind mit den exakten Massen der Hauptisotope berechnet. Die angegebenen Werte beschreiben die beobachtete Masse m/z , wobei im Massenbereich $m/z < 1000$ gewöhnlich das $M+H^+$ bzw. $M+Na^+$ -Ion die intensivsten Signale ergeben. Die Beschreibung der Massenspektren wurde auf Signale mit einer Intensität > 15 % sowie auf charakteristische Signale > 5 % beschränkt (die Signalintensität in % ist in Klammern angegeben). Die Genauigkeit des Massenspektrometers beträgt ca. $\pm 0,2$.

Hochaufgelösete Massenspektren (HRMS) wurden an einem MAT 95ST (Trap) mit einer „CS-gun“ und an einem Micromass Autospec mittels LSIMS-FAB Technik direkt von den auf Zellulosemembran synthetisierten Verbindungen erhalten.

Kernspinresonanz-(NMR-)Spektren wurden an den Geräten Varian Unity-plus 300 und Unity-plus 500 aufgenommen. Als interner Standard diente in ¹H-NMR-Spektren Tetramethylsilan ($\delta_H = 0,00$ ppm) oder Signale der Restprotonen aus CDCl₃ ($\delta_H = 7,24$ ppm) oder [D₆]-DMSO ($\delta_H = 2,50$ ppm). Die ¹³C-NMR-Spektren wurden breitbandentkoppelt und, wenn nicht anders angegeben, mittels internem Standard referenziert (CDCl₃: $\delta_C = 77,0$ ppm, [D₆]-DMSO: $\delta_C = 39,4$ ppm). Alle Verschiebungen (δ) sind in ppm, alle Kopplungskonstanten (J) in Hz angegeben. Bei den Kopplungen handelt es sich, wenn nicht anders angegeben, um *H,H*-Kopplungen. Alle Spektren wurden bei 25°C aufgenommen.

SPOT-Synthese

Die automatische SPOT-Synthese erfolgte mit dem Gerät Autospot Robot AMS 222 (Abimed, Langenfeld, Deutschland) unter Anwendung der Steuersoftware Autospot XL Ver. 2.02. Die benötigten Steuerdateien, in denen Ort und Sequenzen der SPOTs festgelegt wurden, wurden mit den Programmen LISA und DIGEN (beide: Jerini Bio Tools GmbH, Berlin, Deutschland) angefertigt. Die Waschschrte erfolgten in Edelstahlschalen (Merck Eurolab), die auf einem Wipptisch (Labortechnik Fröbel, Lindau/Bodensee, Deutschland) bewegt wurden. Für Reaktionen bei erhöhter Temperatur wurde die Membran in einer Edelstahlschale auf einer regelbaren Heizmatte (Merck Eurolab) erwärmt oder in einer mit einem Glasdeckel verschlossenen Glasschale in einem Haushaltsmikrowellenofen bei 810

W Mikrowellenleistung behandelt. Einzelne SPOTs wurden mit einem Bürolocher ausgestanzt und zur Weiterbehandlung in eine Mikrotiterplatte oder 2,0 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Thermomixer 5437, Zentrifuge 5475C und Vakuumzentrifuge 5301 der Firma Eppendorf wurden zur Behandlung von ausgestanzten SPOTs in Eppendorf-Gefäßen verwendet. Zur Beschleunigung des Lösungsvorganges von Reagenzien für die SPOT-Synthese wurde ein Ultraschallbad verwendet (Sonomatic 300 PC). Zur Spaltung des Photolinkers **51** wurde UV-Licht verwendet, welches mit dem Gerät Vilber Lourmat TFX 20 LC (7 mW/cm² bei 320-390 nm, Bestrahlungsfläche: 20 x 20 cm) erzeugt wurde. Bei der angegebenen UV-Energiedichte handelt es sich um Herstellerangaben.

Bindungsstudien

Der monoklonale Antikörper TAB-2 wurden von Prof. Dr. W. Höhne (Institut für Biochemie, Charité, Humboldt-Universität, Berlin) zur Verfügung gestellt.

Die Bestimmung von Bindung an zellulosegebundenen [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken erfolgte mit dem LumiImager™ der Firma Boehringer Mannheim (Mannheim, Deutschland), bei der auch die Reagenzien *Blocking Reagent* und *Luminescence Substrate Solution A* und *B* erworben wurden. Die verwendete TRIS-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) war 10 mM und auf pH = 8,0 eingestellt. Der anti-Maus IgG Nachweisantikörper wurde von Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

Agardiffusions-Assay

Die Reporterhefen wurden von der Firma Jerini Bio Tools GmbH zur Verfügung gestellt.

6.2 Synthesen an polymeren Harzkugeln

6.2.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: Synthese von Peptiden am Syntheseharz

Fmoc-Rinkamid-Harz (0,41 mmol/g) wird in einen Kunststoffreaktor mit Fritte (10 ml) eingewogen und mit 2,0 ml DMF versetzt. Nach Filtration wird die Fmoc-Gruppe durch Behandlung mit Piperidin (2,0 ml, 20 % in DMF, 1 x 1 min, 1 x 15 min) abgespalten. Im Anschluss wird das Harz mit DMF (3 x 5,0 ml) MeOH (3 x 5,0 ml) und DCM (2 x 5,0 ml) gewaschen.

Beschreibung am Beispiel der Aktivierung von Fmoc-Gly-OH für 100 mg Harz: Fmoc-Gly-OH (0,3 mmol) wird in 0,50 ml NMP gelöst und mit DIC (0,15 mmol) versetzt. Nach 30 min wird ggf. gebildeter Niederschlag mittels Zentrifugation abgetrennt. Die so erhaltende Lösung wird zum Harz gegeben. Nach 30 min Reaktionszeit wird das Harz gewaschen (DMF; 3 x 5,0 ml, MeOH; 3 x 5,0 ml, DCM; 2 x 5,0 ml) und durch einen leichten Luftstrom getrocknet. Zur Abspaltung der Fmoc-Gruppe wird wie oben beschrieben verfahren.

AAV 2: Synthese von 2,4,6-Triamino-[1,3,5]-triazine am Synthescharz

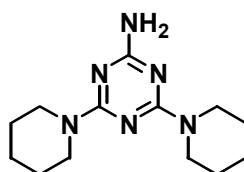
Fmoc-Rinkamid-Harz (0,41 mmol/g) oder Fmoc-Peptid-Rinkamid-Harz wird in einen Kunststoffreaktor mit Fritte (10 ml) eingewogen und mit 2,0 ml DMF versetzt. Nach Filtration wird die Fmoc-Gruppe durch Behandlung mit Piperidin (2,0 ml, 20 % in DMF, 1 x 1 min, 1 x 15 min) abgespalten. Im Anschluss wird das Harz gewaschen (DMF; 3 x 5,0 ml, MeOH; 3 x 5,0 ml, DCM; 3 x 5,0 ml) und durch einen leichten Luftstrom getrocknet. Man gibt eine 2 M Lösung von Cyanurchlorid **5** in DCM mit 1 % DIEA zu dem Harz und lässt 30 Minuten reagieren. Der Überschuss an Reagenzlösung wird entfernt, das Harz gewaschen (DCM; 2 x 5 ml; DMF; 2 x 5,0 ml, MeOH; 1 x 5,0 ml, DCM; 3 x 5,0 ml) und durch einen leichten Luftstrom getrocknet. Zur Substitution des zweiten Chloratoms am Dichlor-[1,3,5]-triazinrest wird das Harz mit einer 5 M (bzw. eine gesättigte) Lösung in NMP des entsprechenden Amines für 30 min bei Raumtemperatur versetzt. Anschliessend wird der Amin-Überschuss entfernt, das Harz gewaschen (DMF; 3 x 5,0 ml, MeOH; 3 x 5,0 ml, DCM; 3 x 5,0 ml) und getrocknet. Das verbleibende Chloratom wird durch Tränken des Harzes mit einer 5 M (bzw. eine gesättigte) Lösung in NMP des entsprechenden Amines durch dreiminütige Mikrowellenbestrahlung substituiert, wobei diese Prozedur einmal wiederholt wird. Hierbei ist zu beachten, dass das Harz gerade gut befeuchtet ist, da ein zu grosser Überschuss an Aminlösung in der Mikrowelle explosionsartig verdampfen kann (trotz Harzkügelchen kann es zu Siedeverzügen kommen). Anschliessend wird das Harz intensiv gewaschen (DMF; 5 x 5,0 ml, MeOH; 5 x 5,0 ml, DCM; 5 x 5,0 ml). Zur Abspaltung des Triazins vom Harz und ggf. gleichzeitiger Entfernung von Seitenkettenschutzgruppen wird das Harz mit TFA (95 % TFA in wässrigem DCM, 5,0 ml) versetzt. Nach 20 Minuten wird die Lösung in einen Kolben überführt und das Harz mit TFA (95 % in H₂O, 1,0 ml) gewaschen. Es wird Wasser (6,0 ml) zugesetzt und die Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt. Das Produkt wird zweimal in 10 ml Acetonitril:Wasser oder Dioxan:Wasser (1:1) aufgenommen und gefriergetrocknet. Man erhält das Produkt als Salz der TFA in Form eines weissen Pulvers.

Das Rohprodukt wird mittels HPLC-MS analysiert und ggf. mittels präp. HPLC gereinigt.

6.2.2 Spezielle Synthesen

6.2.2.1 Modellverbindungen

4,6-Di-piperidin-1-yl-[1,3,5]-triazin-2-ylamin **53**



53 wurde nach AAV 2 (200 mg Tentagel™ Rinkamid-Harz; 0,41 mmol/g) dargestellt. In Verkürzung der Vorschrift wurde das Dichlor-[1,3,5]-triazin derivatisierte Harz direkt mit einer 5 M Lösung von Piperidin unter Mikrowellenbestrahlung umgesetzt.

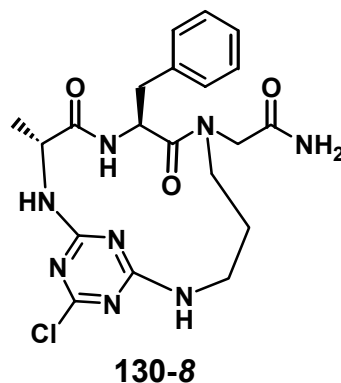
Es wurden 12,3 mg **53** in Form eines weissen Pulvers erhalten.

53: C₁₃H₂₂N₆; R_t = 11,98 min; ber. (M+H⁺): 263,3 gef.: 263,1 (100)

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ = 1,48 (m 10H); 1,59 (m 6H); 3,64 (m 4H); 5,18 (s 2H).

¹³C-NMR (75,45 MHz, CDCl₃): δ = 24,78; 25,77; 44,34; 127,32; 128,60; 131,98.

2-(6-Benzyl-15-chlor-3-methyl-4,7-dioxo-2,5,8,12,14,16,17-heptaaza-bicyclo[11.3.1]heptadeca-1(16),13(17),14-trien-8-yl)-acetamid **130-8**



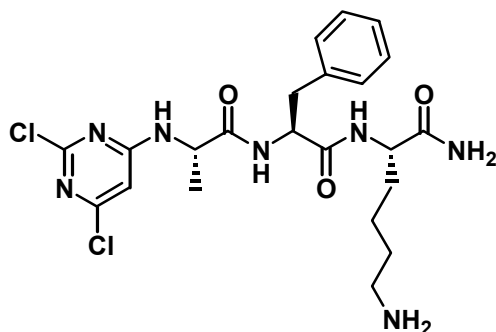
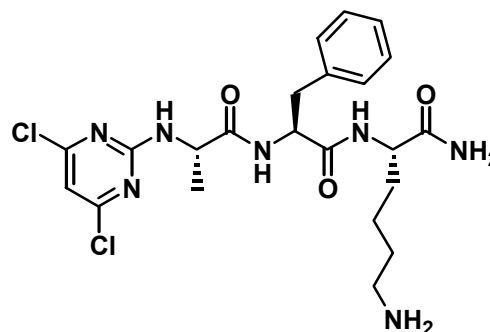
Die Synthese des trimeren Peptomers erfolgte an 300 mg Tentagel™ Rinkamid-Harz (0,41 mmol/g). Die freie Aminogruppen des Harzes werden mit 4 ml einer 0,4 M Lösung von Bromessigsäureanhydrid in DCM acyliert (2 x 15 min). Das Harz wurde gewaschen (DMF; 3 x 5,0 ml, MeOH; 3 x 5,0 ml, DCM; 3 x 5,0 ml) und für 2 x 30 min mit 4 ml einer 5 M Lösung von Mono-Boc-1,3-diaminopropan versetzt. Nach Waschen des Harzes (DMF; 3 x 5,0 ml, MeOH; 3 x 5,0 ml, DCM; 3 x 5,0 ml) erfolgte die Synthese des Dipeptidteil nach AAV 1. Nach Entfernen der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe mit 20 %-iger Piperidin-Lösung in DMF und Waschen des Harzes (DMF; 3 x 5,0 ml, MeOH; 3 x 5,0 ml, DCM; 3 x 5,0 ml) erfolgte die Immobilisierung durch 30 min Inkubation des Syntheseharzes mit einer 50 %-igen Lösung von Cyanurchlorid in DCM (v/v) mit 1 % DIEA. Die Überschüsse wurden durch Waschen des Harzes (DMF; 3 x 5,0 ml, MeOH; 3 x 5,0 ml, DCM; 3 x 5,0 ml) entfernt. Zur Abspaltung der Verbindung vom Harz und gleichzeitiger Entfernung der Boc-Gruppe an der ε-Gruppe des Lysins wird das Harz mit TFA (95 % TFA in wässrigem DCM, 5,0 ml) versetzt. Nach 20 Minuten wird die Lösung in einen Kolben überführt und das Harz mit TFA (95 % in H₂O, 1,0 ml) gewaschen. Es wird H₂O (6,0 ml) zugesetzt und die Lösungsmittel durch Gefriertrocknen entfernt. Die Cyclisierung erfolgte durch Behandlung einer 1 mMol Lösung der linearen Verbindung in Acetonitril mit 10 % DIEA für 45 min. Anschliessend wird im Vakuum zur Trockenheit eingeeengt. Nach HPLC-chromatographischer Aufreinigung erhält man 7,9 mg **130-8** Form weissen Pulvers.

130-8: C₂₀H₂₅ClN₈O₃; R_t = 9,59 min; ber. (M+H⁺): 461,3 gef.: 461,2 (100)

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ = 7,88 (d 7Hz, 1H), 7,58 (m 2H), 7,46 (d 8 Hz, 1H), 7,28-7,13 (m), 4,73 (d 18Hz, 1H), 4,28 (m 1H), 4,31 (m 1H), 3,8-3,5 (m 6H), 2,97 (t 8Hz, 2H), 2,76 (d 11 Hz, 2H), 1,72 (m 1H), 1,61 (m 1H), 1,10 (d 8Hz, 3H).

¹³C-NMR (75,45 MHz, CDCl₃): δ = 173,86; 172,67; 170,67; 167,37; 164,65; 139,14; 127,81; 125,96; 52,79; 49,89; 35,20; 34,28; 18,06; 16,85.

6-Amino-2-{2-[2-(2,6-dichloro-pyrimidin-4-ylamino)-propionylamino]-3-phenyl-propionylamino}-hexansäureamid **138c** und 6-Amino-2-{2-[2-(4,6-dichloro-pyrimidin-4-ylamino)-propionylamino]-3-phenyl-propionylamino}-hexansäureamid **138d**

**138 c****138 d**

Die Synthese des Tripeptides erfolgte an 500 mg Tentagel™ Rinkamid-Harz (0,41 mmol/g) nach AAV 1. Nach Entfernen der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe mit 20 %-iger Piperidin-Lösung in DMF und Waschen des Harzes (DMF; 3 x 5,0 ml, MeOH; 3 x 5,0 ml, DCM; 3 x 5,0 ml) erfolgte die Immobilisierung durch zweistündiger Inkubation des Syntheseharzes mit einer 50 %-igen Lösung von 2,4,6-Trichlorpyrimidin in NMP (v/v) mit 10 % DIEA bei 80°C. Die Überschüsse wurden durch Waschen des Harzes (DMF; 3 x 5,0 ml, MeOH; 3 x 5,0 ml, DCM; 3 x 5,0 ml) entfernt. Zur Abspaltung Regioisomer vom Harz und gleichzeitiger Entfernung der Boc-Gruppe an der ϵ -Gruppe des Lysins wird das Harz mit TFA (95 % TFA in wässrigem DCM, 5,0 ml) versetzt. Nach 20 Minuten wird die Lösung in einen Kolben überführt und das Harz mit TFA (95 % in H₂O, 1,0 ml) gewaschen. Es wird H₂O (6,0 ml) zugesetzt und die Lösungsmittel durch Gefriertrocknen entfernt. Nach HPLC-chromatographischer Aufreinigung erhält man 21 mg **138c** und 18 mg **138d** Form weissen Pulvers.

138c : C₂₂H₂₉Cl₂N₇O₃; R_t = 9,23 min; ber. (*M*+H⁺): 510,3 gef.: 510,2 (100)

¹H-NMR (500MHz, [D₆]-DMSO): δ = 8,34 (d 8Hz, 1H), 8,26 (d 8Hz, 1H), 7,95 (d 8Hz, 1H), 7,69 (s, 2H), 7,22 (m, 5 H), 7,17 (m 2H), 6,62 (s, 1H), 4,51 (m, 2H), 4,18 (m, 1H), 4,05-3,80 (s, 1H), 3,03 (m, 1H), 2,84 (m, 1H), 2,76 (m, 2H), 1,66 (m, 1H), 1,51 (m, 2H) 1,31-1,22 (m, 5H)

¹³C-NMR (125,68 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 173,14; 171,51; 170,51; 163,31; 158,82; 156,89; 137,58; 129,10; 127,96; 126,21; 103,00; 53,89; 52,01; 49,24; 37,17; 31,51; 26,64; 22,08; 18,21

138d : C₂₂H₂₉Cl₂N₇O₃; R_t = 10,33 min; ber. (*M*+H⁺): 510,3 gef.: 510,2 (100)

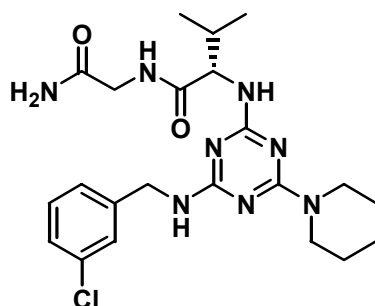
¹H-NMR (500MHz, [D₆]-DMSO): δ = 8,18 (d 8Hz, 1H), 8,04 (d 8Hz, 1H), 7,97 (d 8Hz, 1H), 7,69 (s, 3H), 7,20 (m, 5 H), 7,16 (m 2H), 6,92 (s, 1H), 4,52 (m, 1H), 4,31 (q 8H, 1H), 4,16 (m, 1H), 3,03 (m, 1H), 2,84 (m, 1H), 2,76 (m, 2H), 1,66 (m, 1H), 1,51 (m, 2H) 1,28-1,20 (m, 5H)

¹³C-NMR (125,68 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 173,08; 171,94; 170,43; 160,52; 137,19; 128,92; 128,87; 127,69; 125,92; 108,4; 53,76; 51,85; 50,17; 38,62; 37,06; 31,09; 26,33; 21,83; 17,63

6.2.2.2 Verbindungen für ELISA Experimente

Die Synthesen der jeweiligen Dipeptide erfolgte nach AAV 1 unter Einsatz der entsprechenden Aminosäurederivate.

N-Carbamoylmethyl-2-[4-(3-chlorobenzylamino)-6-piperidin-1-yl-[1,3,5]-triazin-2-ylamino]-3-methyl-butynamid **18-6-19**



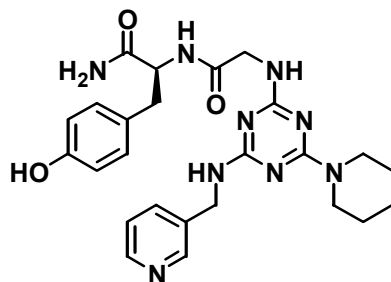
18-6-19 wurde nach AAV 2 dargestellt; die Immobilisierung von **5** erfolgte an einem Rink-Linker–Gly-Leu-derivatisiertem Synthescharz (200 mg). 3-Chlorbenzylamin wurde zur Chlorsubstitution bei Raumtemperatur, Piperidin unter Mikrowellenbestrahlung eingesetzt. Nach Abspaltung vom Synthescharz wurden 16 mg **18-6-19** als weisses Pulver erhalten.

18-6-19: C₂₂H₃₁ClN₈O₂; R_t = 13,44 min; ber. (M+H⁺): 475,2 gef.: 475,2 (100), 359,1 (20)

¹H-NMR (500MHz, [D₆]-DMSO): δ = 8,36 (d 8Hz, 1H), 7,97 (sb, 2H), 7,50 (s, 1H), 7,45-7,30 (m, 3H), 7,11 (d 10Hz, 1H), 4,50 (sb, 2H), 4,20 (m, 1H), 4,16 (m, 1H), 3,63 (s, 2H), 3,01 (sb, 2H), 2,03 (m, 1H), 1,64 (m, 1H), 1,56 (m, 1H), 1,43 (m, 1H), 0,95- 0,70 (m, 6H)

¹³C-NMR (125,68 MHz, [D₆]-DMSO): δ = 172,70; 172,391; 167,89; 165,88; 158,16; 157,91; 131,20; 130,23; 128,19; 127,43; 126,17; 57,52; 43,72; 43,63; 43,13; 30,48; 25,36; 23,58; 22,19; 21,61; 19,23; 17,71

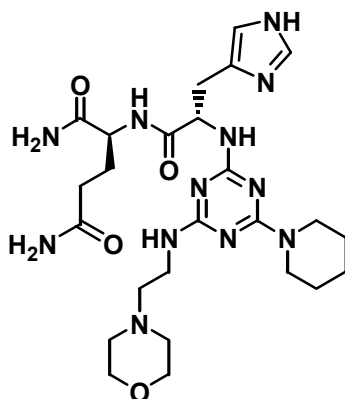
3-(4-Hydroxy-phenyl)-2-(2-{4-piperidin-1-yl-6-[(pyridin-3-ylmethyl)-amino]-[1,3,5]-triazin-2-ylamino}-acetyl)-propionamid **19-6-10**



19-6-10 wurde nach AAV 2 dargestellt; die Immobilisierung von **5** erfolgte an einem Rink-Linker–Tyr-Gly derivatisiertem Synthescharz (200 mg). 3-Picolylamin wurde zur Chlorsubstitution bei Raumtemperatur, Piperidin unter Mikrowellenbestrahlung eingesetzt. Nach Abspaltung vom Synthescharz wurden 16 mg **19-6-10** als weisses Pulver erhalten.

19-6-10: C₂₅H₃₁N₉O₃; R_t = 8,01 min; ber. (M+H⁺): 506,3 gef.: 506,1 (100)

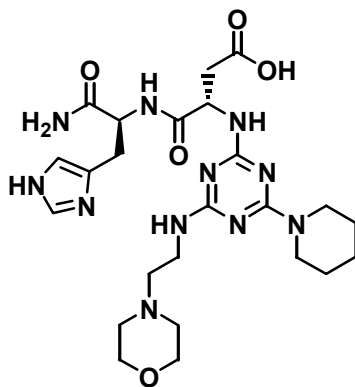
2-{3-(1H-Imidazol-4-yl)-2-[4-(2-morpholin-4-yl-ethylamino)-6-piperidin-1-yl-[1,3,5]-triazin-2-ylamino]-propionylamino}-pentansäurediamid **14-7-6**



14-7-6 wurde nach AAV 2 dargestellt; die Immobilisierung von **5** erfolgte an einem Rink-Linker–Gln-His derivatisiertem Synthescharz (200 mg). 4-(2-Aminoethyl)-morpholin wurde zur Chlorsubstitution bei Raumtemperatur, Piperidin unter Mikrowellenbestrahlung eingesetzt. Nach Abspaltung vom Synthescharz wurden 12 mg **8-7-6** als weisses Pulver erhalten.

14-7-6: C₂₅H₄₀N₁₂O₄; R_t = 6,14 min; ber. (M+H⁺): 573,3 gef.: 573,3 (100), 436,3 (20), 419,2 (20), 287,3 (20)

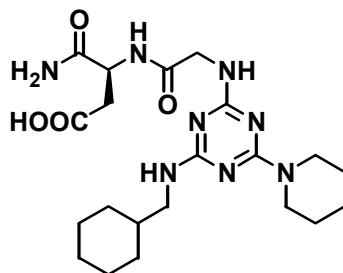
N-[1-Carbamoyl-2-(1H-imidazol-4-yl)-ethyl]-3-[4-(2-morpholin-4-yl-ethylamino)-6-piperidin-1-yl-[1,3,5]-triazin-2-ylamino]-bernsteinsäure **3-7-6**



3-7-6 wurde nach AAV 2 dargestellt; die Immobilisierung von **5** erfolgte an einem Rink-Linker–Asp-His derivatisiertem Synthescharz (200 mg). 4-(2-Aminoethyl)-morpholin wurde zur Chlorsubstitution bei Raumtemperatur, Piperidin unter Mikrowellenbestrahlung eingesetzt. Nach Abspaltung vom Synthescharz wurden 20 mg **3-7-6** als weisses Pulver erhalten.

3-7-6: C₂₄H₃₇N₁₁O₅; R_t = 6,49 min; ber. (M+H⁺): 560,3 gef.: 560,2 (100), 406,2 (20), 280,8 (35)

3-{2-[4-(Cyclohexylmethyl-amino)-6-piperidin-1-yl-[1,3,5]-triazin-2-ylamino]-acetylamino}-Bernsteinsäure **6-3-1**

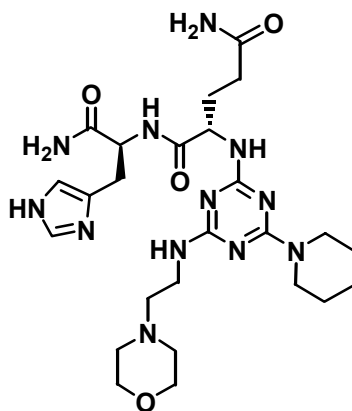


6-3-1 wurde nach AAV 2 dargestellt, die Immobilisierung von **5** erfolgte an einem Rink-Linker-Asp-Gly derivatisiertem Synthescharz (200 mg). Aminomethylcyclohexan wurde zur Chlorsubstitution bei Raumtemperatur, Piperidin unter Mikrowellenbestrahlung eingesetzt. Nach Abspaltung vom Synthescharz wurden 18 mg **6-3-1** als weisses Pulver erhalten.

6-3-1: $C_{21}H_{34}N_8O_4$; $R_t = 12,76$ min; ber. ($M+H^+$): 463,3 gef.: 463,2 (100), 331,1 (20)

1H -NMR (500MHz, $[D_6]$ -DMSO): $\delta = 12,6$ - $12,2$ (s_b , 1H), 7,1 (d 8Hz, 2H), 4,5 (m, 1H), 3,8-3,6 (m, 5H), 3,1 (t 6H, 2H), 2,7-2,6 (m 1H), 1,7-1,4 (m, 6H), 1,2-1,1 (m, 2H), 0,8 (s_b , 1H)

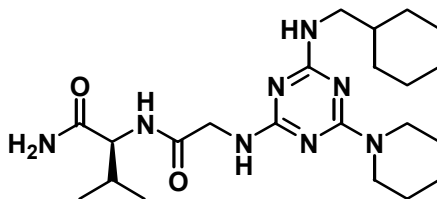
2-[4-(2-Morpholin-4-yl-ethylamino)-6-piperidin-1-yl-[1,3,5]-triazin-2-ylamino]-pentansäure 5-amid 1-{[1-carbamoyl-2-(1H-imidazol-4-yl)-ethyl]-amid} **7-14-6**



7-14-6 wurde nach AAV 2 dargestellt; die Immobilisierung von **5** erfolgte an einem Rink-Linker-His-Gln derivatisiertem Synthescharz (200 mg). 4-(2-Aminoethyl)-morpholin wurde zur Chlorsubstitution bei Raumtemperatur, Piperidin unter Mikrowellenbestrahlung eingesetzt. Nach Abspaltung vom Synthescharz wurden 20 mg **7-14-6** als weisses Pulver erhalten.

7-14-6: $C_{25}H_{40}N_{12}O_4$; $R_t = 6,30$ min; ber. ($M+H^+$): 573,3 gef.: 573,2 (100), 419,2 (40)

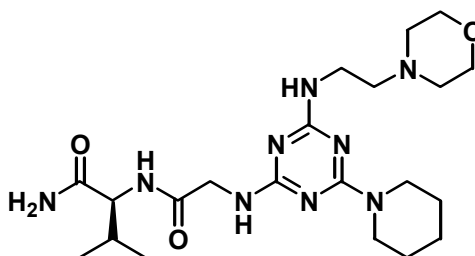
2-{2-[4-(Cyclohexylmethyl-amino)-6-piperidin-1-yl-[1,3,5]-triazin-2-ylamino]-acetylamino}-3-methyl-butynamid **A1**



A1 wurde nach AAV 2 dargestellt; die Immobilisierung von **5** erfolgte an einem Rink-Linker-Val-Gly derivatisiertem Synthescharz (200 mg). Aminomethylcyclohexan wurde zur Chlorsubstitution bei Raumtemperatur, Piperidin unter Mikrowellenbestrahlung eingesetzt. Nach Abspaltung vom Synthescharz wurden 14 mg **A1** als weisses Pulver erhalten.

A1: C₂₂H₃₈N₈O₂; R_t = 14,25 min; ber. (M+H⁺): 447,3 gef.: 447,2 (100), 331,1 (20)

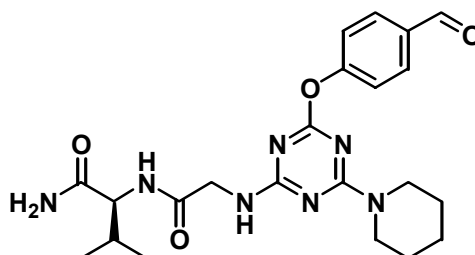
3-Methyl-2-{2-[4-(2-morpholin-4-yl-ethylamino)-6-piperidin-1-yl-[1,3,5]-triazin-2-ylamino]-acetylamino}-butynamid **A6**



A6 wurde nach AAV 2 dargestellt, die Immobilisierung von **5** erfolgte an einem Rink-Linker-Val-Gly derivatisiertem Synthescharz (200 mg). 4-(2-Aminoethyl)-morpholin wurde zur Chlorsubstitution bei Raumtemperatur, Piperidin unter Mikrowellenbestrahlung eingesetzt. Nach Abspaltung vom Synthescharz wurden 16 mg **A6** als weisses Pulver erhalten.

A6: C₂₁H₃₇N₉O₃; R_t = 8,54 min; ber. (M+H⁺): 464,3 gef.: 464,0 (100)

2-{2-[4-(4-Formyl-phenoxy)-6-piperidin-1-yl-[1,3,5]-triazin-2-ylamino]-acetylamino}-3-methyl-butynamid **A9**

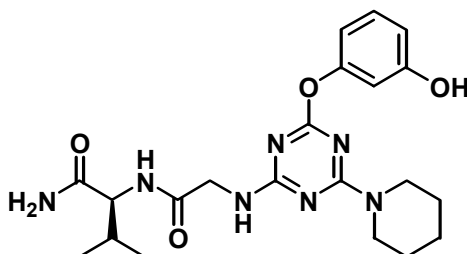


A9 wurde nach AAV 2 dargestellt; die Immobilisierung von **5** erfolgte an einem Rink-Linker-Val-Gly derivatisiertem Synthescharz (200 mg). Das Cäsiumsalz von *p*-Hydroxybenzaldehyd wurde zur Chlorsubstitution bei Raumtemperatur, Piperidin unter Mikrowellenbestrahlung eingesetzt. Nach Abspaltung vom Synthescharz wurden 14 mg **A9**

als weisses Pulver erhalten.

A9: C₂₂H₂₉N₇O₄; R_t = 12,47 min; ber. (*M*+H⁺): 456,2 gef.: 455,9 (100), 419,1 (90), 340,1 (20)

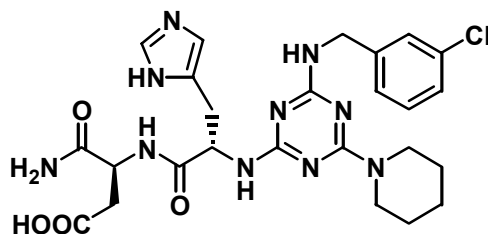
2-{2-[4-(3-Hydroxyphenoxy)-6-piperidin-1-yl-[1,3,5]-triazin-2-ylamino]-acetylamino}-3-methyl-butyramid **A10**



A10 wurde nach AAV 2 dargestellt; die Immobilisierung von **5** erfolgte an einem Rink-Linker-Val-Gly derivatisiertem Synthescharz (200 mg). Das Cäsiumsalz von Resorcin wurde zur Chlorsubstitution bei Raumtemperatur, Piperidin unter Mikrowellenbestrahlung eingesetzt. Nach Abspaltung vom Synthescharz wurden 12 mg **A10** als weisses Pulver erhalten.

A10: C₂₁H₂₉N₇O₄; R_t = 11,50 min; ber. (*M*+H⁺): 444,2 gef.: 443,9 (100), 328,1 (10)

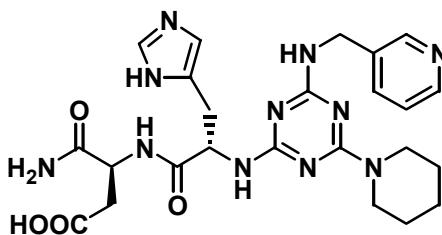
3-[2-[4-(3-Chlorobenzylamino)-6-piperidin-1-yl-[1,3,5]-triazin-2-ylamino]-hexansäure-6-amid 1-{[1-carbamoyl-3-(3H-imidazol-4-yl)-ethyl]-amid} **D4**



D4 wurde nach AAV 2 dargestellt; die Immobilisierung von **5** erfolgte an einem Rink-Linker-Asp-His derivatisiertem Synthescharz (200 mg). 3-Chlorbenzylamin wurde zur Chlorsubstitution bei Raumtemperatur, Piperidin unter Mikrowellenbestrahlung eingesetzt. Nach Abspaltung vom Synthescharz wurden 12 mg **D4** als weisses Pulver erhalten.

D4: C₂₅H₃₁ClN₁₀O₄; R_t = 11,36 min; ber. (*M*+H⁺): 571,2 gef.: 570,9 (100)

3-[2-[4-(Pyridin-3-ylmethyl)-amino)-6-piperidin-1-yl-[1,3,5]-triazin-2-ylamino]-bernsteinsäure-4-amid 1-{[1-carbamoyl-3-(3H-imidazol-4-yl)-ethyl]-amid} **D5**



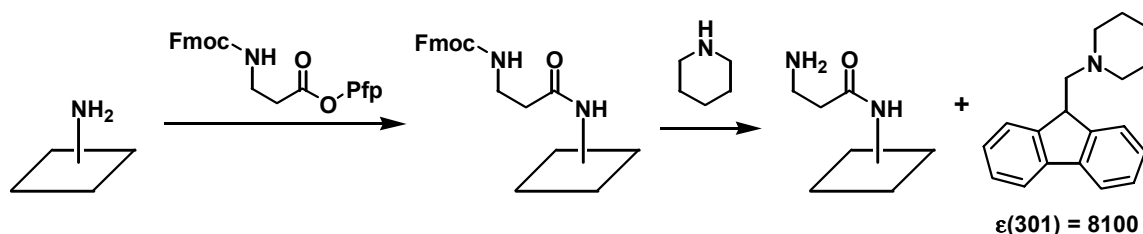
D5 wurde nach AAV 2 dargestellt, die Immobilisierung von **5** erfolgte an einem Rink-Linker–Asp-His derivatisiertem Synthescharz (200 mg). 3-Picolylamin wurde zur Chlorsubstitution bei Raumtemperatur, Piperidin unter Mikrowellenbestrahlung eingesetzt. Nach Abspaltung vom Synthescharz wurden 10 mg **D5** als weisses Pulver erhalten.

D5: C₂₄H₃₁N₁₁O₄; R_t = 6,81 min; ber. (M+H⁺): 538,3 gef.: 538,0 (100), 269,6 (60)

6.3 Synthesen an planaren Oberflächen

6.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 3: Bestimmung des Derivatisierungsgrades von aminoderivatisierten Zellulosemembranen modifiziert nach J. Eichler *et al.*^[92]



Der Derivatisierungsgrad lässt sich zuverlässig durch Messung der UV-Absorption des Dibenzofulven-Piperidin Adduktes **C** nach Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe einer membrangebundenen Aminosäure bestimmen.

Methode A: Quantifizierung freier Aminofunktionen

Ein SPOT (0,23 cm²) wird ausgestanzt und in einem 2,0 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 50 µl Fmoc-β-Ala-OPfp (0,6 M in DMF) versetzt. Nach 30 Minuten wird die Lösung entfernt und der SPOT mit DMF gewaschen (5 x 1,0 ml). In einem zweiten 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wird der SPOT mit 1,0 ml Piperidin (20 % in DMF) versetzt. Nach 20 Minuten wird die UV-Absorption der unverdünnten Lösung bei λ = 301 nm bestimmt [Vergleichszelle: Stammlösung Piperidin (20% in DMF)]. Aus der Extinktion (E) wird der Derivatisierungsgrad nach der unten dargestellten Formel berechnet (ε₃₀₁ = 8100). Bei hohen Derivatisierungsgraden (Extinktion > 1,5) muss die Messlösung verdünnt werden.

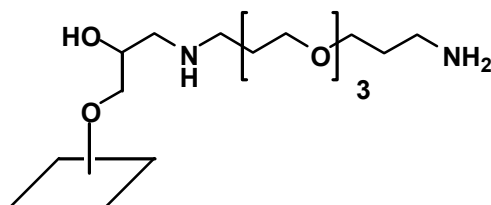
$$\text{Derivatisierungsgrad } [\mu\text{mol}/\text{cm}^2] = \frac{E \cdot V [\text{ml}] \cdot 1000}{8100 \cdot F [\text{cm}^2]} \cdot \frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}}$$

mit E = Extinktion bei 301 nm; V = Reagenzvolumen, mit dem der SPOT versetzt wurde; F = Fläche des SPOTs (typischerweise 0,23 cm²).

Methode B: Quantifizierung einer membrangebundenen Fmoc-Aminosäure

Ein SPOT (0,23 cm²) wird ausgestanzt und in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1,0 ml Piperidin (20% in DMF) versetzt. Zur Quantifizierung wird wie unter Methode A beschrieben verfahren.

AAV 4: Aminoderivatisierte Zellulose (3-[3-{2-(2-[3-Aminopropoxy]-ethoxy)-ethoxy}-propylamino]-2-hydroxy-propyl- Zellulose) **27** nach N. Heine^[51]



A.) Hochbeladungsprotokoll (600 - 1400 nmol/cm²)

In eine leere Instrumentenschale gibt man nacheinander Epibromhydrin **24** (4,0 ml), eine Lösung von Perchlorsäure (0,40 ml einer 60 %-igen Lösung in H₂O) in Dioxan (35,6 ml) und die vorbereitete Membran und verschliesst das Gefäß. Nach 3 h bei 25°C gibt man Methanol (100 ml) zu. Nach 30 min. dekantiert man ab und wäscht mit Methanol (2 x 50 ml). Die an der Luft getrocknete Membran gibt man in 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin **26** (40 ml), welches zuvor auf 80°C erwärmt wurde. Nach 1 h dekantiert man und inkubiert anschliessend bei 25°C nacheinander mit MeOH (2 x 50 ml, 5 min.), NaOMe (5 M in MeOH, 2 h), MeOH (50 ml, 5 min.) H₂O (4 x 100 ml, 5 min.), MeOH (3 x 50 ml) und lässt die Membran trocknen.

Der Derivatisierungsgrad wird durch Inkubieren von drei SPOTs (jeweils 0,23 cm²) mit einer Lösung von Fmoc-β-Ala-OPfp (0,6 M, 30 min) in DMF, waschen mit DMF (3 x 2,0 ml), getrenntem versetzten der SPOTS mit 20 % Piperidin/DMF und Bestimmung der Absorbtion des DBF-Piperidin Adduktes (ε₃₀₁=8100) erhalten. Die Derivatisierung beträgt 500 - 1500 nmol/cm².

B.) Niedrigbeladungsprotokoll (100-500 nmol/cm²)

Die Präparation erfolgt wie bei A.) mit den folgenden Unterschieden:

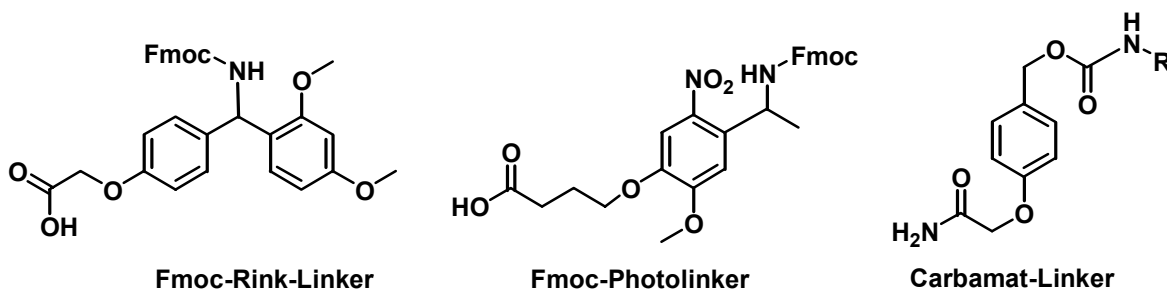
1. Man lässt die Epibromhydrin-Lösung 1 Stunde einwirken.
2. Man wendet das Diamin **26** als Lösung in DMF (20%) bei 25°C an.

Die Derivatisierung beträgt 100 - 500 nmol/cm².

AAV 5: Glycin-Ester-derivatisierte Zellulosemembran **95**

Diese Methode liefert gleichzeitig eine aminoderivatisierte Zellulosemembran und ein basenlabiles Linkersystem. Die Veresterung erfolgt in Anlehnung an Wenschuh *et al.*^[99] In eine leere Instrumentenschale gibt man eine Zellulosemembran und inkubiert diese mit 40 ml einer Lösung aus 2,38 g (8,0 mmol) Fmoc-Gly-OH, 1,27 ml (16,0 mmol) NMI und 1,56 ml (9,6 mmol) DIC in wasserfreiem DMF für drei Stunden. Anschliessend wird die Membran gewaschen (DMF, 3 x 10 min; MeOH, 2 x 5 min; DCM, 1 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min). In einem erweiterten Waschschritt werden freie Aminogruppen durch Acetylierung blockiert (DMF, 2 x 2 min; DMF/Ac₂O/DIEA [70:10:20 (v/v), 2 x 15 min], und erneut gewaschen (DMF, 3 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 1 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und anschliessend an der Luft getrocknet. Anhand von drei SPOTs, die nur zu diesem Zweck vorgesehen wurden, wird der Derivatisierungsgrad nach AAV 3B bestimmt.

AAV 6: Anbringen von Linkermolekülen an planare Oberflächen durch SPOT-Synthese



Die Membran wird stets in einer Edelstahl-Instrumentenschale behandelt. Die Waschschritte werden unter Bewegung des Lösungsmittels auf einem Wipptisch durchgeführt. Beim Abgiessen des Lösungsmittels wird die Membran mit einer Pinzette vorsichtig angehoben, um unter der Membran befindliches Lösungsmittel ablaufen zu lassen (Ausnahme: Waschschritte mit wässrigen Lösungen).

Zunächst wird eine Lösung des gewünschte Linkers in aktivierter Form bereitgestellt:

Rink: 0,3 mmol von 4-[(2,4-Dimethoxy-phenyl)-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-methyl]-phenoxy}-essigsäure werden in 900 µl einer 0,33 M Lösung von Pentafluorphenol in NMP gelöst und mit 0,3 mmol DIC versetzt. Nach ca. 30 min ist die Umsetzung zum Pentafluorphenylester beendet und die Lösung von **35** einsatzbereit.

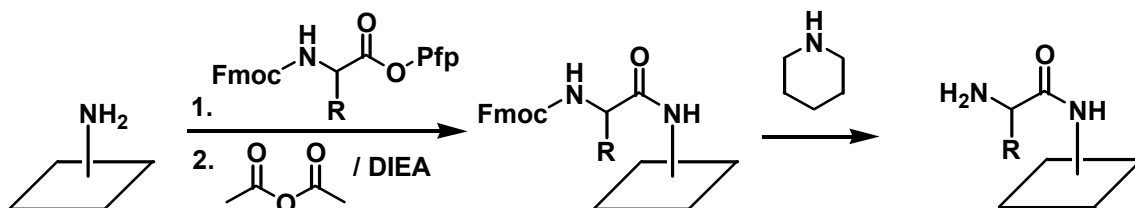
Photolinker: 0,5 mmol von 4-[4-(2,4-Dimethoxy-phenyl)-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-ethyl]-2-Methoxy-5-Nitrophenoxy]-buttersäure werden in 900 µl einer 0,55 M Lösung von Pentafluorphenol in NMP gelöst und mit 0,5 mmol DIC versetzt. Nach ca. 30 min ist die Umsetzung zum Pentafluorphenylester beendet und die Lösung einsatzbereit.

Die Lösung der aktivierten Linker wird an einer esterfrei aminoderivatisierten planaren Oberfläche durch Pipettieren aufgetragen (Dreifachkopplung, 3 x 20 min; eine Markierung der Positionen kann zuvor mit einem Bleistift erfolgen). Dabei wird hier und in allen folgenden Schritten stets das gleiche Volumen (2,0 µl an der Zellulose bzw. 1,0 µl an der PP-Membran) angewendet. Die Überschüsse werden durch Waschen entfernt (DMF, 3 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 1 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min). In einem erweiterten Waschschritt werden freie Aminogruppen durch Acetylierung blockiert (DMF, 2 x 2 min; DMF/Ac₂O/DIEA [70:10:20 (v/v), 2 x 15 min], die Membran gewaschen (DMF, 3 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 1 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und anschliessend an der Luft getrocknet. Anhand von drei SPOTs, die nur zu diesem Zweck vorgesehen wurden, wird der

Derivatisierungsgrad nach AAV 3B bestimmt. Die Membran wird den Bedingungen einer Fmoc-Abspaltung unterzogen (Piperidin (20 % in DMF), 2 x 10 min), gewaschen (DMF, 5 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und an der Luft getrocknet.

Carbamatlanker: Auf eine aminoderivatisierte PP-Membran wird mit Bleistift ein 1 x 1 cm Raster aufgezeichnet. Die PP-Membran wird durch Inkubation in einer 2 M Lösung von Bromessigsäurebromid in DCM mit 0,3 M DABCO innerhalb von 30 min acyliert. Die Membran wird gewaschen (DMF, 3 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 1 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und anschliessend an der Luft getrocknet. Eine 1 M Cäsiumphenolat-Lösung in DMSO wird aus *p*-Hydroxy-Benzaldehyd und 0,5 Äq. Cs₂CO₃ durch Rühren bei 60°C für 2 h hergestellt. Nach Abkühlen der Lösung werden jeweils 1 µl in das Raster gespottet. Nach 30 min Reaktionszeit wird das Spotten zwei Mal wiederholt. Die Membran wird gewaschen (DMF, 3 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 1 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und an der Luft getrocknet. Die Reduktion der Aldehydfunktion erfolgt durch Inkubation der Membran mit einer 2 M Natriumborhydridlösung in MeOH für 15 min. Anschliessend wird die Membran gewaschen (MeOH, 2 x 2 min; DMF, 3 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 1 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und an der Luft getrocknet. Das aktivierte Carbonat wird durch Inkubation der Membran in einer 1 M Lösung von 4-Nitrochloroformiat in DCM mit 0,01 Äq. NEM für eine Stunde gebildet. Nach Waschen der Membran (DMF, 3 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 1 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und trocknen an der Luft, kann die Umsetzung mit dem entsprechenden Diamin (Tabelle 3 Seite 22) erfolgen.

AAV 7: Manuelle Peptidsynthese an planaren Oberflächen unter SPOT-Bedingungen



Auf eine aminoderivatisierte planare Oberfläche wird mit Bleistift ein 1 x 1 cm Raster aufgezeichnet. Die Membran wird stets in einer Edelstahl-Instrumentenschale behandelt. Die Waschschritte werden unter Bewegung des Lösungsmittels auf einem Wipptisch durchgeführt. Mittels einer Eppendorf Multi-Step-Pipette wird in die Mitte der Rasterkreuze 2 µl (auf Zellulose) oder 1 µl (auf PP-Membran) einer 0,6 M Aminosäure-Pentafluorphenolesterlösung in NMP gespottet. Das Spotten der Reagenzien wird nach jeweils 20 min zweimal wiederholt. Nach beendeter Kopplung wird der Überschuss durch Waschen der Membran entfernt (DMF, 3 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 1 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und anschliessend an der Luft getrocknet. Nicht acylierte freie Aminogruppen werden durch Baden mit einer 20 %-igen Acetanhydrid-Lösung mit 10 % DIEA in DMF acetyliert, um den Aufbau von Fehlsequenzen zu vermeiden. Anschliessend wird die Membran erneut gewaschen. Die *N*-terminale Fmoc-Schutzgruppe der Peptide wird durch Inkubation mit einer 20 % Piperidin-Lösung in DMF für 20 min entfernt. Nach Waschen (DMF, 3 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 1 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und an der Luft trocknen ist die Membran für die Kopplung der nächsten Aminosäure bereit, so dass die Synthesecyclus solange durchlaufen werden können, bis die gewünschte Peptidsequenz erreicht ist.

Eine Unterbrechung der Synthese kann nach der Kopplung der Aminosäuren oder Acetylierung erfolgen.

AAV 8: Halbautomatische SPOT-Synthese von Peptiden

Die halbautomatische Synthese einer Peptid-Bibliothek erfolgt in Analogie zu der manuellen SPOT-Synthese (AAV 7). Folgende Unterschiede sind jedoch zu beachten:

- Die Pipettierschritte werden unter Verwendung eines Pipettierroboters (Autospot Robot AMS 222) durchgeführt. Die Steuerdateien, in denen Ort und Sequenzen der SPOTs festgelegt ist, wurden mit dem Programm LISA erzeugt. In einer Synthese können gleichzeitig 40 Bausteine verwendet werden. Die Acetylierung mit Acetanhydrid und die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe erfolgt nicht am Pipettierroboter, sondern durch Inkubation der Membran in einer Metallschale mit der entsprechenden Lösung (AAV 7).
- Um die Repositionierung der Membran nach den Waschschritten zu ermöglichen werden freie Aminogruppen nach Schritt A) (SPOT-Definition) durch zusätzliches Waschen mit einer 0,01%igen Lösung von Bromphenolblau in MeOH angefärbt und ausgewählte SPOTs (z.B. Ecken der Membran) mit Bleistift markiert.
- Es ist dafür zu sorgen, dass im ersten Schritt (SPOT-Definition) ein um 10% geringeres Pipettiervolumen als in den übrigen Schritten gewählt wird, um Fehlsequenzen am Rand des SPOTs vermeiden.
- Zur parallelen Synthese von „kleinen“ SPOTs für Festphasen-Bindungsstudien und „grossen“ SPOTs für analytische Zwecke auf einer Membran unter Verwendung von *einer* Synthese-Steuerdatei hat es sich bewährt, an der Stelle der „grossen“ SPOTs mehrere identische Sequenzen zu definieren. Das führt zur Mehrfachpipettierung kleiner Volumina an derselben Stelle und damit zu grösseren SPOTs.
- Zur Dokumentation der Synthese hat sich die Aufnahme von Lichtbildern mit einer Digitalkamera nach den Schritten A) und C) bewährt.
- Niederschläge aus Diisopropylharnstoff, die bei der Aktivierung von Aminosäuren (Linker, Monomere) auftreten, werden zusätzlich zur Zentrifugation durch Filtration (Spritzenfilter aus PTFE, 0,45 µm) abgetrennt, um einen Verschluss der Nadeln zu vermeiden.
- Alle Reagenzien müssen vor jedem Synthesecyclus frisch bereitgestellt werden, da die Gefässe während der Synthese geöffnet sind und flüchtige Bestandteile langsam verdampfen. Es hat sich bewährt, die Reagenzien für jeden Schritt vor Beginn der gesamten Synthese in entsprechende Gefässe abzufüllen und bei 4°C zu lagern. Vor den einzelnen Cyclen wird der benötigte Satz an Reagenzien entnommen. Monomere werden unter Beachtung der Voraktivierungszeit erst kurz vor der Synthese aktiviert.

AAV 9: Manuell SPOT-Synthese von Peptoiden

Die SPOT-Synthese von Peptoiden folgt den Grundzügen der Peptoidsynthese nach Figliozzi *et al.*^[161] nach einem für die SPOT-Synthese modifizierten Protokoll (zu den Methoden der SPOT-Synthese vergl. AAV 7). Die Synthese kann zwischen den Schritten – vorzugsweise nach der Einführung des Aminbausteines – unterbrochen werden. Dazu wird die getrocknete Membran in Kunststoffolie eingeschweisst und bei -26°C gelagert. Die verwendeten Amine können in Stammlösungen (2 ml Gefässe) bei 4°C mindestens 12 Monate unzersetzt gelagert werden.

Bei Synthesen am Photolinker müssen besondere Vorkehrungen getroffen werden, um eine vorzeitige Abspaltung zu verhindern: Bei allen Operationen, bei denen die Membran der

Einwirkung von Licht ausgesetzt ist, wird Tageslicht durch Raumabdunklung ausgeschlossen. Desgleichen wird die Raumbeleuchtung im Umkreis von ca. 4 m ausgeschaltet, so dass die Membran nur indirekt beleuchtet wird.

A) Peptoidsynthese 1:

Sub-Monomerschritt 1: Bromacetylierung

Alle SPOTs werden durch Pipettieren einer Lösung von Bromessigsäure-2,4-dinitrophenylester (1 M in NMP, Doppelkopplung, 2 x 15 min) acyliert. Die Membran wird gewaschen (DMF, 5 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und an der Luft getrocknet.

B.) Peptoidsynthese 2:

Sub-Monomerschritt 2: Bromsubstitution

In Abhängigkeit von der gewünschten Peptoid-Sequenz werden verschiedene Amin-Lösungen auf die SPOTs pipettiert (Konzentrationen je nach Amin: Feststoffe: 5 M in NMP oder H₂O bzw., falls diese Konzentration nicht erreicht werden kann, verdünnen einer gesättigten Lösung mit etwas Lösungsmittel (10 %), um eine Kristallisation bei der Anwendung zu verhindern – die Konzentration sollte jedoch nicht geringer als 0,8 M sein; wässrigen Lösungen wird 0,05 % Tween[®] 20 zugesetzt; Flüssigkeiten: 50 %-ig in NMP; jeweils Dreifachkopplung, 3 x 15 min). Die Membran wird gewaschen (DMF, 4 x 2 min; MeOH, 1 x 2 min; 0,5 M wässrige NaOH, 1 x 1 min; H₂O, 5 x 2 min; bei pH > 8, weitere Waschschrte mit H₂O; MeOH, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und an der Luft getrocknet.

C.) Wiederholung der Schritte A.) und B.) bis die endgültige Oligomerenlänge erreicht ist.

AAV 10: Manuelle SPOT-Synthese von Peptomeren

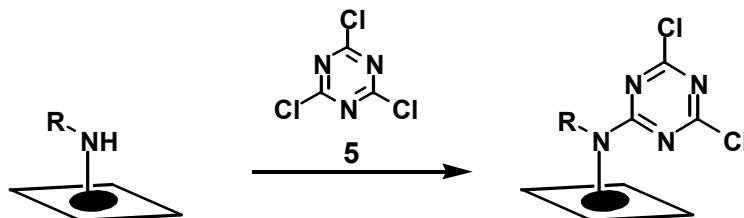
Die Synthese der Peptomere gliedert sich in Peptidsynthese- und Peptoidsyntheseabschnitte. Die Durchführung der jeweiligen Teile der Synthese erfolgt nach AAV 7 (Peptidteil) und AAV 9 (Peptoidteil). Bei der Kopplung von Aminosäuren auf die sek. Amine des Peptoidbausteins werden hierbei jedoch nicht die Pentafluorphenylester, sondern die Anhydride der Aminosäuren eingesetzt.

AAV 11: Halbautomatische SPOT-Synthese von Peptomeren

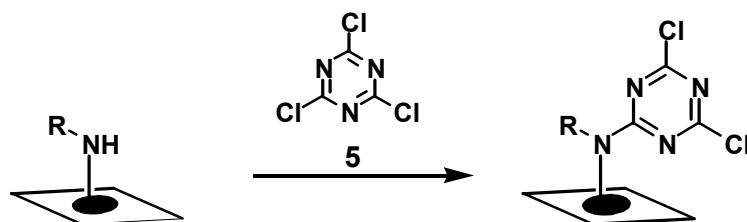
Die halbautomatische SPOT-Synthese von Peptomeren verläuft analog der manuellen Synthese (AAV 10). Unterschiede werden im folgenden aufgelistet:

- Die Pipettierschritte werden unter Verwendung eines Pipettierroboters (Autospot Robot AMS 222) durchgeführt. Die Steuerdateien, in denen Ort und Sequenzen der SPOTs festgelegt ist, wurden mit dem Programm LISA erzeugt, welches speziell an die Synthese nach der Sub-Monomer-Methode angepasst wurde. In einer Synthese können gleichzeitig 40 Sub-Monomer *und* 40 Monomer-Bausteine verwendet werden.
- Um die Repositionierung der Membran nach den Waschschrten zu ermöglichen werden freie Aminogruppen nach Schritt A) (SPOT-Definition) durch zusätzliches Waschen mit einer 0,01 %-igen Lösung von Bromphenolblau in MeOH angefärbt und ausgewählte SPOTs (z.B. Ecken der Membran) mit Bleistift markiert.
- Es ist dafür zu sorgen, dass in Schritt A) (SPOT-Definition) ein um 20 % geringeres Pipettiervolumen als in den übrigen Schritten gewählt wird, um Fehlsequenzen am Rand des SPOTs vermeiden.

- Zur parallelen Synthese von „kleinen“ SPOTs für Festphasen-Bindungsstudien und „grossen“ SPOTs für analytische Zwecke auf einer Membran unter Verwendung von *einer* Synthese-Steuerdatei hat es sich bewährt, an der Stelle der „grossen“ SPOTs mehrere identische Sequenzen zu definieren. Das führt zur Mehrfachpipettierung kleiner Volumina an derselben Stelle und damit zu grösseren SPOTs.
- Zur Dokumentation der Synthese hat sich die Aufnahme von Lichtbildern mit einer Digitalkamera nach den Schritten A) und C) bewährt.
- Niederschläge aus Diisopropylharnstoff, die bei der Aktivierung von Aminosäuren (Linker, Monomere) auftreten, werden zusätzlich zur Zentrifugation durch Filtration (Spritzenfilter aus PTFE, 0,45 µm) abgetrennt, um einen Verschluss der Nadeln zu vermeiden.
- Die Vorratsgefässe für Aminlösungen werden erst direkt vor der Synthese geöffnet, um eine Verflüchtigung von Lösungsmittel und Reagenzien zu vermindern.
- Alle Reagenzien müssen vor jedem Synthesecyclus frisch bereitgestellt werden, da die Gefässe während der Synthese geöffnet sind und flüchtige Bestandteile langsam verdampfen. Es hat sich bewährt, die Reagenzien für jeden Schritt vor Beginn der gesamten Synthese in entsprechende Gefässe abzufüllen und bei 4°C zu lagern. Vor den einzelnen Cyclen wird der benötigte Satz an Reagenzien entnommen. Monomere werden unter Beachtung der Voraktivierungszeit erst kurz vor der Synthese aktiviert.

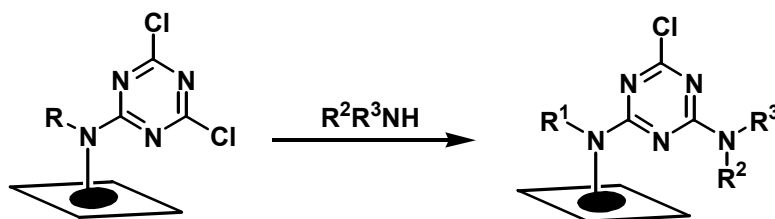
AAV 12: Immobilisierung von Cyanurchlorid **5** an aminoderivatisierter Zellulose

Es wird eine 2 M Lösung Cyanurchlorid **5** in DCM hergestellt. Eine trockene aminoderivatisierter Zellulosemembran wird 30 min mit der Lösung in einer Metallschale inkubiert, hierbei richtet sich die benötigte Menge an Lösung nach der Grösse der Membran und der Schale. Das Volumen sollte so bemessen sein, dass die Membran gut bedeckt ist. Zur besseren Reaktion wird die Schale vorsichtig während der 30 min auf einem Wipptisch bewegt. Anschliessend werden die Überschüsse an **5** durch Waschen mit 2 x DCM, 2 x DMF und 2 x DCM für je 5 min entfernt und die Membran an der Luft getrocknet.

AAV 13: Immobilisierung von Cyanurchlorid **5** an aminoderivatisierter PP-Membran

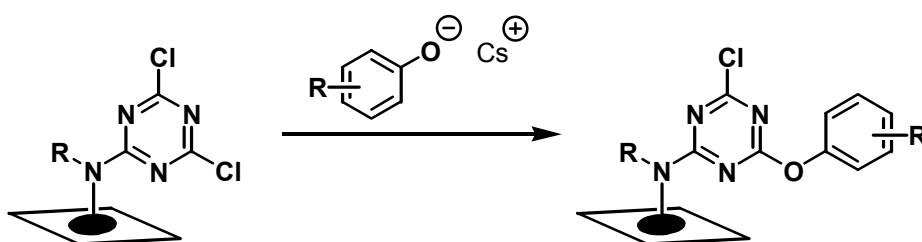
Es wird eine 2 M Lösung **5** in DCM hergestellt und mit 10 % DIEA (v/v) versetzt. Eine trockenen aminoderivatisierter PP-Membran wird 30 min mit der Lösung in einer Metallschale inkubiert, hierbei richtet sich die benötigte Menge an Lösung nach der Grösse der Membran und der Schale. Das Volumen sollte so bemessen sein, dass die Membran gut bedeckt ist. Zur besseren Reaktion wird die Schale vorsichtig während der 30 min auf einem Wipptisch bewegt. Anschliessend werden die Überschüsse an **5** durch Waschen mit 2 x DCM, 2 x DMF und 2 x DCM für je 5 min entfernt und die Membran an der Luft getrocknet.

AAV 14: Monochlorsubstitution an membrangebundenen Dichlor-[1,3,5]-triazinen durch Amine



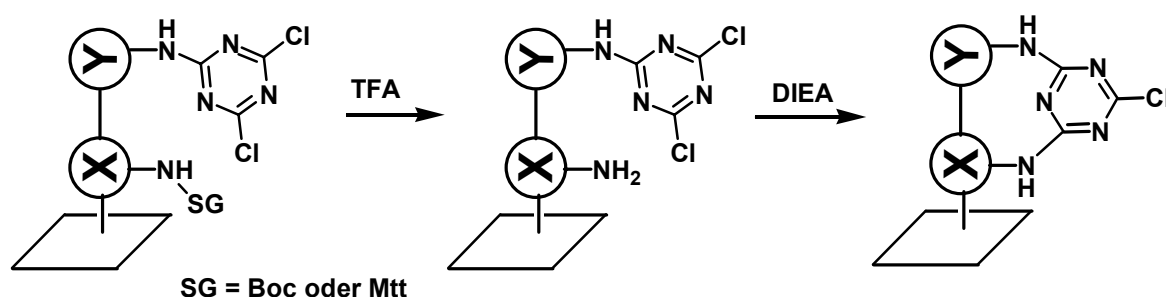
Die gewünschte Amin-Lösungen wird auf die SPOTs pipettiert 2 μ l (auf Zellulose) oder 1 μ l (auf PP-Membran). Die Konzentrationen ist je nach Amin unterschiedlich: Feststoffe: 5 M in NMP oder H₂O bzw., falls diese Konzentration nicht erreicht werden kann, verdünnen einer gesättigten Lösung mit etwas Lösungsmittel (10 %), um eine Kristallisation bei der Anwendung zu verhindern – die Konzentration sollte jedoch nicht geringer als 0,8 M sein; wässrigen Lösungen wird 0,05 % Tween[®] 20 zugesetzt; Flüssigkeiten: 50 %-ig in NMP), wobei eine Reaktionszeit von 30 min so genau wie möglich eingehalten werden muss. Die Membran wird gewaschen (DMF, 4 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und an der Luft getrocknet.

AAV 15: Monochlorsubstitution an membrangebundenen Dichlor-[1,3,5]-triazinen durch Phenolate



Die Cäsiumphenolate werden durch Lösen der entsprechenden Phenole in DMSO und Zugabe von 0,5 Äq. Cs_2CO_3 hergestellt. Die Suspension wird zwei Stunden bei 60°C gerührt, wobei am Ende verbleibender Niederschlag durch langsame Zugabe von DMSO aufgelöst wird. Die Phenolatlösung wird auf die SPOTs pipettiert $2\ \mu\text{l}$ (auf Zellulose) oder $1\ \mu\text{l}$ (auf PP-Membran), wobei eine Reaktionszeit von 30 min so genau wie möglich eingehalten werden muss. Die Membran wird gewaschen (DMF, $4 \times 2\ \text{min}$; MeOH, $2 \times 2\ \text{min}$; DCM, $2 \times 2\ \text{min}$; Et_2O , $1 \times 2\ \text{min}$) und an der Luft getrocknet.

AAV 16: Intramolekulare Monochlorsubstitution an membrangebundenen Dichlor-[1,3,5]-triazinen durch Aminogruppen

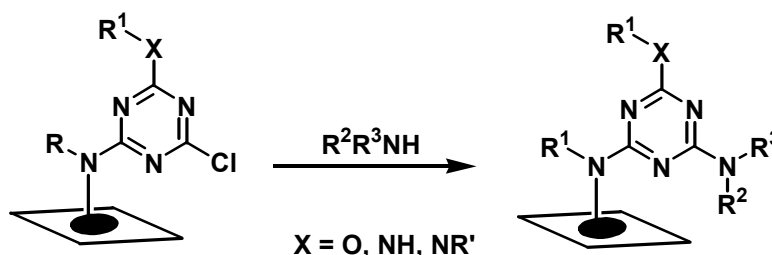


Die Entschützung der Boc-Gruppe von der Aminfunktion erfolgt durch Behandlung der Membran mit 90 %-iger TFA in DCM für eine Stunde. Nach Waschen der Membran mit DCM ($2 \times 3\ \text{min}$) wird die Membran für zwei Stunden mit einer 1 M wässrigen HCl-Lösung inkubiert, um eventuell entstandenes Trifluoracetylierungsprodukte zu hydrolisieren. Anschliessend wird die Membran gewaschen (H_2O , $3 \times 2\ \text{min}$; DMF, $4 \times 2\ \text{min}$; MeOH, $2 \times 2\ \text{min}$; DCM, $2 \times 2\ \text{min}$; Et_2O , $1 \times 2\ \text{min}$) und an der Luft getrocknet.

Die Entschützung im Fall der Mtt-Gruppe erfolgt durch Behandlung der Membran mit einer 1 %-igen TFA-Lösung in DCM mit 5 % TIPS für eine Stunde. Im Anschluss wird die Membran gewaschen (DMF, $4 \times 2\ \text{min}$; MeOH, $2 \times 2\ \text{min}$; DCM, $2 \times 2\ \text{min}$; Et_2O , $1 \times 2\ \text{min}$) und an der Luft getrocknet.

Zur Cyclisierung wird die Membran für 30 min mit einer 10 %-igen DIEA-Lösung in NMP inkubiert, gewaschen (DMF, $4 \times 2\ \text{min}$; MeOH, $2 \times 2\ \text{min}$; DCM, $2 \times 2\ \text{min}$; Et_2O , $1 \times 2\ \text{min}$) und an der Luft getrocknet.

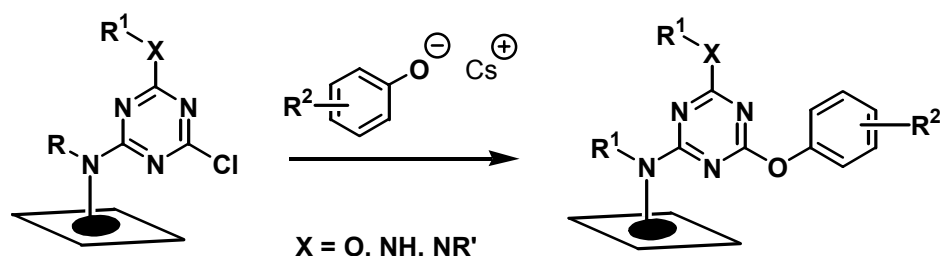
AAV 17: Chlorsubstitution an membrangebundenen Monochlor-[1,3,5]-triazinen durch Amine



Die Membran wird in eine Glasschale (z.B. Petrischale) gelegt, und die Amin-Lösungen (vgl. AAV 14) wird auf die SPOTs pipettiert $2\ \mu\text{l}$ (auf Zellulose) oder $1\ \mu\text{l}$ (auf PP-

Membran). Die Schale wird mit einem Glasdeckel abgedeckt und für 3 min einer Mikrowellenbestrahlung (810 W) ausgesetzt. Anschliessend wird die Membran gewaschen (DMF, 4 x 2 min; Wasser, 2 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und an der Luft getrocknet.

AAV 18: Chlorsubstitution an membrangebundenen Monochlor-[1,3,5]-triazinen durch Phenolate



Die Cäsiumphenolate werden durch Lösen der entsprechenden Phenole in DMSO und Zugabe von 0,5 Äq. Cs₂CO₃ hergestellt. Die Suspension wird zwei Stunden bei 60°C gerührt, wobei am Ende verbleibender Niederschlag durch langsame Zugabe von DMSO aufgelöst wird. Die Membran wird in eine Glasschale (z.B. Petrischale) gelegt, und die Phenolatlösungen wird auf die SPOTs pipettiert 2 µl (auf Zellulose) oder 1 µl (auf PP-Membran). Die Schale wird mit einem Glasdeckel abgedeckt und für 3 min einer Mikrowellenbestrahlung (810 W) ausgesetzt. Anschliessend wird die Membran gewaschen (DMF, 4 x 2 min; Wasser, 2 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und an der Luft getrocknet.

AAV 19: Abspaltung der Syntheseprodukte von den verschiedenen Linkersystemen

Ester- und Photolinker: Zur Seitenkettenschutzgruppen-Abspaltung wird die Membran mit TFA behandelt [TFA/H₂O/TIPS [95/3/2 (v/v)] unter Zusatz von Phenol (1 g/100ml), 2 x 15 min; TFA/CH₂Cl₂/H₂O/TIPS [50/45/3/2 (v/v)] unter Zusatz von Phenol (1 g/100ml), 1 x 2 h. Die verwendete Instrumentenschale wird dabei nicht geschüttelt. Im Anschluss wird die Membran gewaschen (CH₂Cl₂, 2 x 5 min; DMF, 3 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und an der Luft getrocknet.

Die Verbindungen an dem **Esterlinker** werden durch Methylamin in einem Exsikkator innerhalb von 14 h abgespalten.

Vom Photolinker-derivatisierten Membranen **51** werden die Substanzen durch Belichtung der trockenen Membran mit UV-Licht (Vilber Lourmat TFX 20 LC, Einstellung 365 nm, 100 %, 180 min je Seite) abgespalten.

Die SPOTs werden ausgestanzt und können in einem geeigneten Lösungsmittel abgelöst für Assays in Lösung eingesetzt oder analysiert (HPLC, HPLC-MS) werden.

Rink- und Carbamatlinker: Bei diesen beiden Linkersystemen erfolgt die Abspaltung der Seitenschutzgruppen und der Verbindungen von der planaren Oberfläche gleichzeitig. In einen Exsikkator wird eine Schale mit 3 ml einer 90 %-igen TFA-Lösung in DCM gestellt, und dieser 2 Stunden ist der Gasraum mit TFA-Dampf gesättigt, und die Membranen mit dem Rink- oder Carbamatlinker können für 30 min in den Exikator gelegt werden, wobei darauf zu achten ist, dass die Membranen nicht direkt in die Schale mit verbliebener TFA-Lösung gelangen. Nach Beendigung der Abspaltung wird die Membran an der Luft oder ggf. im Vakuum von anhaftender TFA befreit und die SPOTs mit den adsorbierten Verbindungen können ausgestanzt werden.

Alternativ können die Produkte auch „in Lösung“ abgespalten werden. Hierzu werden die SPOTs ausgestanzt, in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit TFA (95 % in DCM, 100 μ l) versetzt. Nach 30 Minuten wird das Lösungsmittel bei 45°C in einer Vakuumzentrifuge entfernt.

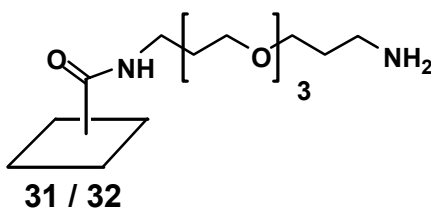
Die adsorbierten Syntheseprodukte werden direkt im Anschluss mit Acetonitril (50 % in H₂O mit 0,1 % TFA, 100 μ l) abgelöst und analysiert (HPLC, HPLC-MS, 10 μ l Injektionsvolumen).

6.3.2 Membranfunktionalisierung

6.3.2.1 Aminofunktionalisierte Zellulosemembran

Die Bedingungen zur Derivatisierung von esterfrei aminofunktionalisierten Zellulosemembran **27** und zur Glycin-Ester-derivatisierten Membran **95** sind in Kapitel 6.3.1 (AAV 4 und AAV 5) beschrieben.

6.3.2.2 Aminofunktionalisierte PP-Membran



6.3.2.2.1 Ausgehend von carbonsäurefunktionalisierten PP-Membranen **28**

Eine carbonsäurefunktionalisierte PP-Membran **28** wird in einer Metallschale mit einer 2 M Lösung von PCl₅ in DCM übergossen, so dass die Membran gut bedeckt ist (die genaue Menge hängt von der Grösse der verwendeten Membran und Metallschale ab). Die Schale wird auf einem Inkubationsschüttler 2 h leicht bewegt. Anschliessend wird die PCl₅-Lösung zügig abgegossen (Vorsichtig, stechender Chlorgeruch) und die Membran direkt mit einer 5 M Lösung von 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin **26** in DCM übergossen, und erneut für 2 h leicht bewegt. Die Membran wird mit DMF, Wasser, Acetonitril, MeOH und DCM je 3 mal à 5 min gewaschen, wobei das Volumen der Waschlösung so bemessen sein muss, dass die Membran beim Schwenken der Schale leicht beweglich ist.

Der Derivatisierungsgrad wird durch Inkubieren von drei SPOTs (jeweils 0,23 cm²) mit einer Lösung von Fmoc- β -Ala-OPfp (0,6 M, 30 min) in DMF, Waschen mit DMF (3 x 2,0 ml), getrenntem Versetzen der SPOTS mit 20 % Piperidin/DMF und Bestimmung der Absorption des DBF-Piperidin Adduktes (ϵ_{301} =8100) bestimmt. Die Derivatisierung beträgt 500 - 1500 nmol/cm². Man erreicht Beladungen an Aminofunktionen in Abhängigkeit von der ursprünglichen Carbonsäurefunktionalisierung von 100-800 nmol/cm².

Die Untersuchungen bzgl. verschiedener Aktivierungsbedingungen von **28** erfolgte in Analogie, wo bei die Art und Konzentration der Reagenzien in Tabelle 1 inklusive der Ergebnisse angegeben sind.

6.3.2.2.2 Ausgehend von methylesterfunktionalisierten PP-Membranen **29**

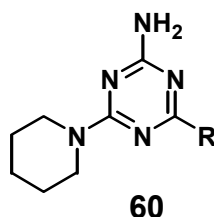
Eine methylesterfunktionalisierte PP-Membran **29** wird in einer Metallschale mit 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecandiamin **26** übergossen, so dass die Membran gut bedeckt ist (die genaue Menge hängt von der Grösse der verwendeten Membran und Metallschale ab). Anschliessend wird die Schale auf 80°C erwärmt und die Methylesterfunktionen im Verlauf von 48 h aminolysiert. Die Membran wird mit DMF, Wasser, Acetonitril, MeOH und DCM je 3 mal à 5 min gewaschen, wobei das Volumen der Waschlösung so bemessen sein muss, dass die Membran beim Schwenken der Schale leicht beweglich ist.

Der Derivatisierungsgrad wird durch Inkubieren von drei SPOTs (jeweils 0,23 cm²) mit einer Lösung von Fmoc-β-Ala-OPfp (0,6 M, 30 min) in DMF, Waschen mit DMF (3 x 2,0 ml), getrenntem Versetzen der SPOTS mit 20 % Piperidin/DMF und Bestimmung der Absorption des DBF-Piperidin Adduktes ($\epsilon_{301}=8100$) erhalten. Die Derivatisierung beträgt 500 - 1500 nmol/cm². Man erreicht Beladungen an Aminofunktionen in Abhängigkeit von der ursprünglichen Methylesterfunktionalisierung von 200-600 nmol/cm².

Die Untersuchungen bzgl. verschiedener Aminolysebedingungen von **29** erfolgte unter den in Tabelle 2 angegebenen Bedingungen. Das Entfernen von Aminüberschüssen und die Bestimmung der Aminoderivatisierung erfolgte wie oben beschrieben.

6.3.3 Spezielle Synthesen von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken an Zellulosemembranen

Untersuchung von Alkylaminen zur Chlorsubstitution unter SPOT-Bedingungen



Eine aminoderivatisierte Zellulosemembran wurde nach AAV 6 mit dem Rink-Linkerderivat **35** acyliert und nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppen wurde Cyanurchlorid **5** nach AAV 12 immobilisiert. Zur Darstellung des Triazins **60** wurden die Amine mit denen in der Tabelle angegebenen Konzentrationen nach AAV 14 am Rink-Linker umgesetzt. Nicht substituierte Chloratome wurden durch Inkubation der Membran bei 80°C (4 h) mit einer 5 M Lösung von Piperidin zur Reaktion gebracht. Nach Entfernen des Piperidinüberschusses (DMF, 4 x 2 min; Wasser, 2 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) wurde das Syntheseprodukt nach AAV 19 abgespalten.

Im Folgenden sind die analytischen Daten der Triazine **60** aufgeführt (die Nummern entsprechen den jeweiligen Tabelleneinträgen).

60-1: Propylamin; $R_t = 11,32$ min; ber. ($M+H^+$): 237,2 gef.: 237,1 (100), 195,1 (6)

60-2: Butylamin; $R_t = 12,41$ min; ber. ($M+H^+$): 251,2 gef.: 251,2 (100), 183,2 (16), 127,2 (6)

- 60-3:** Pentylamin; $R_t = 13,48$ min; ber. ($M+H^+$): 265,2 gef.: 265,0 (100)
- 60-4:** Octylamin; $R_t = 16,54$ min; ber. ($M+H^+$): 307,3 gef.: 307,4 (100), 196,0 (6)
- 60-5:** 3-Methylbutylamin; $R_t = 13,35$ min; ber. ($M+H^+$): 265,2 gef.: 265,3 (100), 195,3 (6)
- 60-6:** Cyclopropylmethylamin; $R_t = 11,62$ min; ber. ($M+H^+$): 249,2 gef.: 249,1 (100)
- 60-7:** Cyclohexylmethylamin; $R_t = 14,25$ min; ber. ($M+H^+$): 291,2 gef.: 291,2 (100), 223,1 (14).
- 60-8:** Allylamin; $R_t = 11,15$ min; ber. ($M+H^+$): 235,3 gef.: 253,2
- 60-9:** Propargylamin; $R_t = 9,95$ min; ber. ($M+H^+$): 233,2 gef.: 233,4
- 60-10:** Isopropylamin; $R_t = 11,34$ min; ber. ($M+H^+$): 237,2 gef.: 237,0 (100), 195,1 (12)
- 60-11:** Isobutylamin; $R_t = 12,49$ min; ber. ($M+H^+$): 251,3 gef.: 251,3 (100), 195,6 (14).
- 60-13:** Cyclohexylamin; $R_t = 13,29$ min; ber. ($M+H^+$): 277,2 gef.: 277,3 (100), 195,4 (14)
- 60-14:** 1-Adamantylamin; $R_t = 15,78$ min; ber. ($M+H^+$): 329,3; gef.: 329,4 (100), 135 (8)
- 60-15:** Dibutylamin; $R_t = 15,47$ min; ber. ($M+H^+$): 307,2 gef.: 307,1 (100), 251,2 (8)
- 60-16:** Dihexylamin; $R_t = 18,92$ min; ber. ($M+H^+$): 363,3 gef.: 363,1 (100)
- 60-17:** 2,2,6,6-Tetrametylpiperidin; ber. ($M+H^+$): 318,3 gef.: nicht nachweisbar

Tabelle 10

Seite 36

- 60-18:** Hydroxylamin; $R_t = 7,15$ min; ber. ($M+H^+$): 211,1 gef.: 211,2
- 60-19:** Ethanolamin; $R_t = 8,17$ min; ber. ($M+H^+$): 239,2 gef.: 239,7 (100), 221,6 (18)
- 60-20:** 3-Amino-1-propanol; $R_t = 8,74$ min; ber. ($M+H^+$): 253,2 gef.: 253,3 (100).
- 60-21:** 4-Amino-1-butanol; $R_t = 9,18$ min; ber. ($M+H^+$): 267,2 gef.: 267,2 (100), 199,2 (18)
- 60-22:** 5-Amino-1-pentanol; $R_t = 9,82$ min; ber. ($M+H^+$): 281,2 gef.: 281,3 (100), 223,7 (10)
- 60-23:** 6-Amino-1-hexanol; $R_t = 10,56$ min; ber. ($M+H^+$): 295,2 gef.: 295,6 (100)
- 60-24:** *rac*-4-Amino-2-butanol; $R_t = 9,89$ min; ber. ($M+H^+$): 267,2 gef.: 267,0 (100), 195,1 (10)
- 60-25:** 2-Amino-1,3-propandiol; $R_t = 7,24$ min; ber. ($M+H^+$): 269,2 gef.: 269,0 (100)

Tabelle 11

Seite 37

- 60-26a:** Ethylendiamin; $R_t = 6,15$ min; ber. ($M+H^+$): 238,2 gef.: 238,1 (100), 221,2 (18), 153,3 (8).
- 60-27:** 1,3-Diaminopropan; $R_t = 6,91$ min; ber. ($M+H^+$): 252,2 gef.: 252,2 (100), 235,3 (26), 207,2 (6)
- 60-28:** 1,4-Diaminobutan; $R_t = 7,34$ min; ber. ($M+H^+$): 266,2 gef.: 266,0 (100), 249,1 (22)

60-29: 1,5-Diaminopentan; $R_t = 8,26$ min; ber. ($M+H^+$): 280,2 gef.: 280,2 (100), 263,3 (12), 195,2 (6)

60-30: 1,6-Diaminohexan; $R_t = 8,70$ min; ber. ($M+H^+$): 294,2 gef.: 294,1 (100), 277,2 (8), 167,7 (20)

60-26b: Mono-Boc-ethylendiamin; $R_t = 6,15$ min; ber. ($M+H^+$): 238,2 gef.: 238,1 (100), 221,2 (22), 153,3 (10).

60-31: Piperazin; $R_t = 5,79$ min; ber. ($M+H^+$): 264,2 gef.: 264,1 (100), 173,2 (10)

Tabelle 12

Seite 38

60-32: 2-Methoxyethylamin; $R_t = 9,51$ min; ber. ($M+H^+$): 253,2 gef.: 253,1 (100), 185,1 (18), 153,3 (14).

60-33: Isopropoxypropylamin; $R_t = 11,86$ min; ber. ($M+H^+$): 295,2 gef.: 295,0 (100), 253,3 (8)

60-34: Tetrahydrofurfurylamin; $R_t = 10,39$ min; ber. ($M+H^+$): 279,2 gef.: 279,2 (100), 223,4 (22), 195,4 (16)

60-35: 4-(2-Aminoethyl)-morpholin; $R_t = 6,75$ min; ber. ($M+H^+$): 308,2 gef.: 308,1 (100), 221,2 (36)

60-36: 4-(3-Aminopropyl)-morpholin; $R_t = 7,29$ min; ber. ($M+H^+$): 322,2 gef.: 322,1 (100), 235,2 (88), 167,2 (12)

60-37: 1-(3-Aminopropyl)-pyrrolidin; $R_t = 7,88$ min; ber. ($M+H^+$): 306,2 gef.: 306,2 (44), 235,2 (100), 207 (6).

60-38: 1-(2-Aminoethyl)-piperidin; $R_t = 7,70$ min; ber. ($M+H^+$): 306,2 gef.: 306,0 (100), 221,3 (34), 173,8 (16)

60-39: 1-(3-Aminopropyl)-4-methylpiperazin; $R_t = 7,03$ min; ber. ($M+H^+$): 335,3 gef.: 335,0 (100), 235,2 (48), 188,3 (32), 168,2 (12).

60-40: 1-Methylpiperazin; $R_t = 6,52$ min; ber. ($M+H^+$): 278,2 gef.: 278,1 (100), 221,1 (26), 153,1 (12).

60-41: (S)-(-)-1-Amino-2-(methoxymethyl)-pyrrolidin; $R_t = 10,30$ min; ber. ($M+H^+$): 308,2 gef.: 308,1 (100), 276,1 (16).

60-42: 2-Aminoacetaldehyd-diethylacetal; gefunden 2-Aminoaldehyd-Substituent; $R_t = 6,96$ min; ber. ($M+H^+$): 237,1 gef.: 237,1 (100)

60-43: 2-Aminoethyl-hydrogensulfat; $R_t = 7,82$ min; ber. ($M+H^+$): 319,2 gef.: 318,9 (100), 239,1 (34)

60-44: 2-(Ethylthio)-ethylamin; $R_t = 11,88$ min; ber. ($M+H^+$): 283,2 gef.: 283,0 (100), 221,2 (12)

60-45: Glycinamid; $R_t = 6,72$ min; ber. ($M+H^+$): 252,1 gef.: 252,0 (100), 235,1 (16), 207,1 (18)

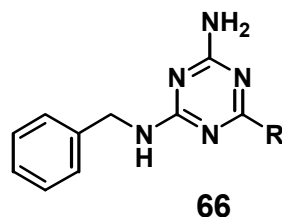
60-46: β -Alaninamid; $R_t = 8,87$ min; ber. ($M+H^+$): 266,2 gef.: 266,2 (100), 207,3 (16)

60-47: Glycinethyester; $R_t = 8,21$ min; ber. ($M+H^+$): 253,1 (*C*-terminale Säure) gef.: 253,3 (56), 195,2 (100)

60-48: Isoleucinethyester; $R_t = 11,45$ min; ber. ($M+H^+$): 309,2 (*C*-terminale Säure) gef.: 309,1 (100), 283,1 (25), 263,1 (34).

60-49: Glutaminsäure(*tert*.butyl)methylester; gefunden freie Säuren $R_t = 8,26$ min; ber. ($M+H^+$): 325,1 gef.: 325,0 (100), 279,1 (12)

Untersuchung von Arylaminen zur Chlorsubstitution unter SPOT-Bedingungen



Eine aminoderivatisierte Zellulosemembran wurde nach AAV 6 mit dem Rink-Linkerderivat **35** acyliert und nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppen wurde Cyanurchlorid **5** nach AAV 12 immobilisiert. Zur Darstellung des Triazins **66** wurden die Amine mit denen in der Tabelle angegebenen Konzentrationen nach AAV 14 am Rink-Linker umgesetzt. Nicht substituierte Chloratome wurden durch Inkubation der Membran bei 80°C (4 h) mit einer 5 M Lösung von Benzylamin zur Reaktion gebracht. Nach Entfernen des Benzylaminüberschusses (DMF, 4 x 2 min; Wasser, 2 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) wurde das Syntheseprodukt nach AAV 19 abgespalten.

Im Folgenden sind die analytischen Daten der Triazine **66** aufgeführt (die Nummern entsprechen den jeweiligen Tabelleneinträgen).

Tabelle 13

Seite 41

67: Benzylamin (Kontrolle mit 3-Chlorbenzylamin); $R_t = 13,40$ min; ber. ($M+H^+$): 341,2 gef.: 341,1 (100)

66-1: 2-Chlorbenzylamin; $R_t = 13,61$ min; ber. ($M+H^+$): 341,2 gef.: 341,1 (100)

66-2: 3-Chlorbenzylamin; $R_t = 13,40$ min; ber. ($M+H^+$): 341,2 gef.: 341,1 (100)

66-3: 4-Chlorbenzylamin; $R_t = 13,28$ min; ber. ($M+H^+$): 341,2 gef.: 341,1 (100), 125,2 (10)

66-4: 2,4-Dichlorbenzylamin; $R_t = 14,08$ min; ber. ($M+H^+$): 375,1 gef.: 375,1 (100), 159,1 (16), 91,1 (10)

66-5: 4-Methoxybenzylamin; $R_t = 12,26$ min; ber. ($M+H^+$): 337,2 gef.: 337,1 (100), 229,3 (14), 121,3 (36).

66-6: 1-Methylnaphtylamin; $R_t = 13,14$ min; ber. ($M+H^+$): 357,2 gef.: 357,1 (100)

66-7: α,α -Diamino-*p*-xylol; $R_t = 8,57$ min; ber. ($M+H^+$): 336,2 gef.: 336,1 (100), 319,2 (46), 221,1 (12).

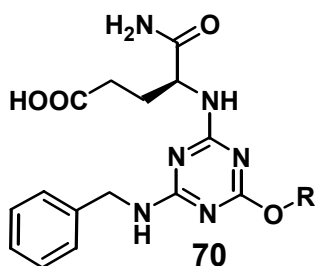
66-8: 2-Phenylethylamin; $R_t = 12,97$ min; ber. ($M+H^+$): 321,1 gef.: 321,0 (100)

- 66-9:** Homoveratrylamin; $R_t = 11,97$ min; ber. ($M+H^+$): 381,2; gef.: 381,2 (100), 165,3(22).
- 66-10:** Tyramin; $R_t = 10,97$ min; ber. ($M+H^+$): 337,2 gef.: 337,1 (100).
- 66-11:** (1S,2S) 2-Amino-1-(4-nitrophenyl)-1,3-propandiol; $R_t = 10,58$ min; ber. ($M+H^+$): 412,2 gef.: 412,0 (100), 394,2 (12), 245,2 (10).
- 66-12:** 3-Phenylpropylamin; $R_t = 13,65$ min; ber. ($M+H^+$): 335,2 gef.: 335,0 (100)
- 66-13:** 3,3-Diphenylpropylamin; $R_t = 15,09$ min; ber. ($M+H^+$): 411,2 gef.: 411,5 (100)
- 66-14:** Dehydroabiethylamin; $R_t = 19,04$ min; ber. ($M+H^+$): 485,3 gef.: 485,7 (100)
- 66-15:** Furfurylamin; $R_t = 11,45$ min; ber. ($M+H^+$): 297,1 gef.: 297,0 (100), 229,1 (14)
- 66-16:** Thiophenmethylamin; $R_t = 11,80$ min; ber. ($M+H^+$): 313,1 gef.: 313,0 (100), 229,1 (16)
- 66-17:** 2-Picolylamin; $R_t = 7,06$ min; ber. ($M+H^+$): 308,2; gef.: 308,1 (100)
- 66-18:** 3-Picolylamin; $R_t = 6,97$ min; ber. ($M+H^+$): 308,2; gef.: 308,1 (100)
- 66-19:** 4-Picolylamin; $R_t = 6,60$ min; ber. ($M+H^+$): 308,2; gef.: 308,0 (100), 175,0 (14)
- 66-20:** Nicotinhydrazin; $R_t = 7,21$ min; ber. ($M+H^+$): 337,1 gef.: 337,1 (100), 217,1 (50), 195,2 (26).
- 66-21:** Imidazol; $R_t = 8,84$ min; ber. ($M+H^+$): 268,1 gef.: 282,2 (100), 91,3 (8)

Tabelle 14

Seite 43

- 66-22:** Anilin; $R_t = 12,04$ min; ber. ($M+H^+$): 293,2 gef.: 293,2 (100), 271,7 (48), 91,3 (16).
- 66-23:** 2,4,6-Trimethylanilin; $R_t = 13,30$ min; ber. ($M+H^+$): 335,2 gef.: 335,7
- 66-24:** 3-Fluoranilin; $R_t = 12,34$ min; ber. ($M+H^+$): 311,1 gef.: 311,2 (100), 91,1 (16)
- 66-25:** 3-Chlor-4-fluoranilin; $R_t = 13,31$ min; ber. ($M+H^+$): 345,1 gef.: 345,4 (100), 347,2 (32), 91,4 (14).
- 66-26:** *p*-Anisidin; $R_t = 11,86$ min; ber. ($M+H^+$): 323,2 gef.: 323,1 (100), 232,2 (24)
- 66-27:** *p*-Phenoxyanilin; $R_t = 14,26$ min; ber. ($M+H^+$): 385,2 gef.: 385,1 (100), 294,3 (8)
- 66-28:** 4-Nitroanilin; ber. ($M+H^+$): 338,2 gef.: nicht nachweisbar
- 66-29:** 2-Amino-4-chlorphenol; $R_t = 12,26$ min; ber. ($M+H^+$): 343,1 gef.: 343,1
- 66-30:** 4-Aminobenzylalcohol; $R_t = 9,84$ min; ber. ($M+H^+$): 323,2 gef.: 323,2 (100), 256 (26), 201 (14)
- 66-31a,b:** 1-Naphtylamin; $R_t = 13,05$ min; ber. ($M+H^+$): 343,2 gef.: 343,6 (100), 252,8 (16).
- 66-32:** 2-Aminopyridin; $R_t = 9,81$ min; ber. ($M+H^+$): 294,3 gef.: 294,2 (100), 120,3 (12)
- 66-34:** 2-Aminothiazol; $R_t = 8,45$ min; ber. ($M+H^+$): 300,1 gef.: 300,1 (100), 283,1 (94), 243,2 (32), 192,2 (12)

Untersuchung von Phenolen zur Chlorsubstitution unter SPOT-Bedingungen

Eine aminoderivatisierte Zellulosemembran wurde nach AAV 6 mit dem Rink-Linkerderivat **35** acyliert und nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppen wurde Fmoc-Glutaminsäure (Seitenketten *t*Bu-geschützt) nach AAV 7 gekoppelt. Nach entfernen der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe Cyanurchlorid **5** wurde nach AAV 12 immobilisiert. Zur Darstellung des Triazins **70** wurden die Phenole mit denen in der Tabelle angegebenen Konzentrationen nach AAV 15 umgesetzt. Nicht substituierte Chloratome wurden durch Inkubation der Membran bei 80°C (4 h) mit einer 5 M Lösung von Benzylamin zur Reaktion gebracht. Nach Entfernen des Benzylaminüberschusses durch Waschen der Membran (DMF, 4 x 2 min; Wasser, 2 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) wurde das Syntheseprodukt nach AAV 19 abgespalten.

Im Folgenden sind die analytischen Daten der Triazine **70** aufgeführt (die Nummern entsprechen den jeweiligen Tabelleneinträgen).

Tabelle 15

Seite 48

70-1: Phenol; $R_t = 11,66$ min; ber. ($M+H^+$): 423,1 gef.: 423,0 (100), 405,9 (14), 378,1 (16)

70-2: 2,4,6-Trimethylphenol; $R_t = 13,49$ min; ber. ($M+H^+$): 465,2 gef.: 465,0 (100), 420,1 (26)

70-3: 4-Fluorphenol; $R_t = 12,08$ min; ber. ($M+H^+$): 441,1 gef.: 441,0 (100), 424,1 (22), 396,1 (41), 378,1 (8)

70-4: Pentafluorphenol; $R_t = 14,01$ min; ber. ($M+H^+$): 513,1 gef.: 513,2 (100), 496,1 (12), 468,4 (26)

70-5: 4-Nitrophenol; $R_t = 12,38$ min; ber. ($M+H^+$): 468,1 gef.: 468,0 (100), 451,1 (18), 423,1 (38)

70-6: 4-Hydroxybenzotrifluorid; $R_t = 13,70$ min; ber. ($M+H^+$): 491,1 gef.: 491,0 (100), 474,1 (16), 446,1 (22)

70-7: 4-Hydroxybenzonitril; $R_t = 11,72$ min; ber. ($M+H^+$): 448,1 gef.: 448,0 (100), 431,6 (32), 404,4 (44)

70-8: Resorcin; $R_t = 10,40$ min; ber. ($M+H^+$): 439,1 gef.: 439,0 (100), 422,1 (18), 394,1 (38)

70-9: (\pm)-1,1'-Bi-(2-naphthol); $R_t = 14,73$ min; ber. ($M+H^+$): 615,1 gef.: 615,1 (100), 598,2 (24), 570,2 (12)

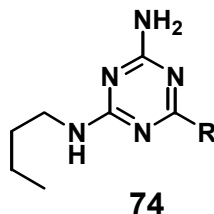
70-10: 4-Hydroxybenzaldehyd; $R_t = 11,09$ min; ber. ($M+H^+$): 451,1 gef.: 450,9 (100), 434,1 (24), 406,1 (38)

70-11: Vanilin; $R_t = 11,34$ min; ber. ($M+H^+$): 481,1 gef.: 481,0 (100), 464,1 (18), 436,1

(38), 418,1 (6)

70-12: 8-Hydroxychinolin; $R_t = 9,75$ min; ber. ($M+H^+$): 474,2 gef.: 474,3 (100), 457,3 (12) 429,9 (20)

Untersuchung von Alkylaminen zur Chlorsubstitution unter SPOT-Bedingungen und Mikrowellenbestrahlung



Eine aminoderivatisierte Zellulosemembran wurde nach AAV 6 mit dem Rink-Linkerderivat **35** acyliert und nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppen wurde Cyanurchlorid **5** nach AAV 12 immobilisiert. Die Modellverbindung wurde durch Umsetzung von *n*-Butylamin mit dem membrangebundenen Dichlor-[1,3,5]-triazin nach AAV 14 erhalten. Zur Darstellung des Triazins **74** wurden die Amine mit denen in der Tabelle angegebenen Konzentrationen nach AAV 17 umgesetzt. Nicht substituierte Chloratome wurden durch Inkubation der Membran bei 80°C (4 h) mit einer 5 M Lösung von Butylamin zur Reaktion gebracht. Nach Entfernen des Butylaminüberschusses (DMF, 4 x 2 min; Wasser, 2 x 2min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) wurde das Syntheseprodukt nach AAV 19 abgespalten.

Im Folgenden sind die analytischen Daten der Triazine **74** aufgeführt (die Nummern entsprechen den jeweiligen Tabelleneinträgen).

Tabelle 17

Seite 52

74-1: Pentylamin; $R_t = 13,07$ min; ber. ($M+H^+$): 253,2 gef.: 253,1 (100)

74-2: Allylamin; $R_t = 10,45$ min; ber. ($M+H^+$): 223,2 gef.: 223,2 (100),

74-3: Cyclohexylmethylamin; $R_t = 13,02$ min; ber. ($M+H^+$): 265,2 gef.: 265,2 (100), 183,2 (20)

74-4: 1-Adamantylamin; $R_t = 15,67$ min; ber. ($M+H^+$): 317,2 gef.: 317,1 (100), 239,0 (20)

74-5: Piperidin; $R_t = 14,98$ min; ber. ($M+H^+$): 251,2 gef.: 251,0 (100)

74-6: 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin; ber. ($M+H^+$): 307,3 gef.: nicht nachweisbar

Tabelle 18

Seite 53

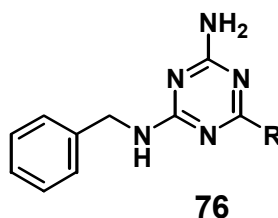
74-7: Hydroxylamin; $R_t = 6,52$ min; ber. ($M+H^+$): 199,1 gef.: 199,0 (100)

74-8: Ethanolamin; $R_t = 7,67$ min; ber. ($M+H^+$): 227,2 gef.: 227,3 (100)

74-9: 3-Amino-1-propanol; $R_t = 8,08$ min; ber. ($M+H^+$): 241,2 gef.: 241,2 (100).

- 74-10:** 6-Amino-1-hexanol; $R_t = 10,22$ min; ber. ($M+H^+$): 283,2 gef.: 283,2 (100), 265,1 (26)
- 74-11:** Mono-Boc-ethylendiamin; freies Amin erhalten; $R_t = 5,91$ min; ber. ($M+H^+$): 225,1 gef.: 226,0 (100), 209,1 (20)
- 74-12:** 1,3-Diaminopropan; $R_t = 6,43$ min; ber. ($M+H^+$): 240,2 gef.: 240,1 (100), 223,2 (18)
- 74-13:** 1,4-Diaminobutan; $R_t = 7,14$ min; ber. ($M+H^+$): 254,2 gef.: 254,2 (100), 237,2 (22)
- 74-14:** 1,5-Diaminopentan; $R_t = 7,75$ min; ber. ($M+H^+$): 268,2 gef.: 268,1 (100)
- 74-15:** 1,6-Diaminohexan; $R_t = 8,44$ min; ber. ($M+H^+$): 282,2 gef.: 282,2 (100)
- 74-16:** Piperazin; $R_t = 6,37$ min; ber. ($M+H^+$): 252,2 gef.: 252,0 (100), 167,1 (20)
- 74-17:** 2-Methoxyethylamin; $R_t = 9,68$ min; ber. ($M+H^+$): 241,2 gef.: 241,0 (100)
- 74-18:** 4-(3-Aminopropyl)-morpholin; $R_t = 7,01$ min; ber. ($M+H^+$): 310,2 gef.: 310,1 (100), 223,3 (38)
- 74-19:** 1-(3-Aminopropyl)-pyrrolidin; $R_t = 7,38$ min; ber. ($M+H^+$): 294,2 gef.: 294,1 (98), 223,2 (100)
- 74-20:** 2-Aminoacetaldehyd-diethylacetal; gefunden 2-Aminoaldehyd-Substituent; $R_t = 6,30$ min; ber. ($M+H^+$): 225,2 gef.: 225,2 (100)
- 74-21:** Glycinamid; $R_t = 5,89$ min; ber. ($M+H^+$): 240,2 gef.: 240,1 (100), 223,2 (24), 195,2 (24)
- 74-22:** β -Alaninamid; $R_t = 7,46$ min; ber. ($M+H^+$): 254,2 gef.: 254,1 (95), 241,1 (38), 195,1 (100), 183,2 (44)
- 74-23:** Glycinethylester; $R_t = 10,18$ min; ber. ($M+H^+$): 269,1 gef.: 269,1 (100), 223,1 (14), 195,3 (20)
- 74-24:** Glutaminsäure(*tert.*butyl)methylester; (gef. freie Säuren) $R_t = 7,75$ min; ber. ($M+H^+$): 313,2 gef.: 313,1 (100), 267,1 (18)

Untersuchung von Arylaminen zur Chlorsubstitution unter SPOT-Bedingungen und Mikrowellenbestrahlung



Eine aminoderivatisierte Zellulosemembran wurde nach AAV 6 mit dem Rink-Linkerderivat **35** acyliert und, nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppen wurde Cyanurchlorid **5** nach AAV 12 immobilisiert. Die Modellverbindung wurde durch Umsetzung von Benzylamin mit dem membrangebundenen Dichlor-[1,3,5]-triazin nach AAV 14 erhalten. Zur Darstellung des Triazins **76** wurden die Amine mit denen in der Tabelle angegebenen Konzentrationen nach AAV 17 umgesetzt. Nicht substituierte Chloratome wurden durch Inkubation der Membran bei 80°C (4 h) mit einer 5 M Lösung von Butylamin zur Reaktion gebracht. Nach Entfernen des Benzylaminüberschusses (DMF, 4 x 2 min; Wasser, 2 x 2min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) wurde

das Syntheseprodukt nach AAV 19 abgespalten.

Im Folgenden sind die analytischen Daten der Triazine **76** aufgeführt (die Nummern entsprechen den jeweiligen Tabelleneinträgen), wobei lediglich die Syntheseprodukte aufgeführt sind, die nicht bereits bei den Untersuchungen bei Raumtemperatur erhalten wurden.

Tabelle 19

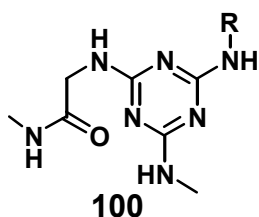
Seite 55

76-10: 1-(3-Aminopropyl)imidazol; $R_t = 7,53$ min; ber. ($M+H^+$): 325,2 gef.: 325,0 (100), 257,2 (52).

Untersuchung von Phenolaten zur Chlorsubstitution unter SPOT-Bedingungen und Mikrowellenbestrahlung

Eine aminoderivatisierte Zellulosemembran wurde nach AAV 6 mit dem Rink-Linkerderivat **35** acyliert und nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppen wurde Cyanurchlorid **5** nach AAV 12 immobilisiert. Die Modellverbindung wurde durch Umsetzung von Benzylamin mit dem membrangebundenen Dichlor-[1,3,5]-triazin nach AAV 14 erhalten. Zur Darstellung des Triazins **80** wurden die Phenolate mit denen in der Tabelle angegebenen Konzentrationen nach AAV 18 umgesetzt. Nicht substituierte Chloratome wurden durch Inkubation der Membran bei 80°C (4 h) mit einer 5 M Lösung von Benzylamin zur Reaktion gebracht. Nach Entfernen des Benzylaminüberschusses (DMF, 4 x 2 min; Wasser, 2 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) wurde das Syntheseprodukt nach AAV 19 abgespalten. Die Syntheseprodukte entsprachen denen von der Untersuchung zur Chlorsubstitution bei Raumtemperatur, so dass die analytischen Daten nicht erneut aufgeführt sind.

Testsynthese am Glycin-Esterlinker



Eine Glycin-derivatisierte Zellulosemembran wird nach AAV 5 erhalten. Cyanurchlorid wird nach AAV 12 an die Aminogruppe des membrangebundenen Glycins immobilisiert. Die Chlorsubstitution erfolgt nach AAV 14 mit **A-01**: Butylamin, **A-02**: 3-Amino-1-propanol, **A-03**: 1,3-Diaminopropan, **A-04**: 3-Chlorbenzylamin und **A-05**: 3-Fluoranilin.

Die Abspaltung unter gleichzeitiger Substitution verbleibender Chloratome am [1,3,5]-Triazinrest erfolgt durch Inkubation der Membran mit gasförmigem Methylamin für 16 h. HPLC-MS-analytisch wurden jeweils 10 % des Rohproduktes eines SPOTs (0,23 cm²) untersucht (Injektionsmenge 10 µl).

100-1: $R_t = 8,27$ min; ber. ($M+H^+$): 268,2 gef.: 268,0 (92), 237,1 (82), 209,2 (100)

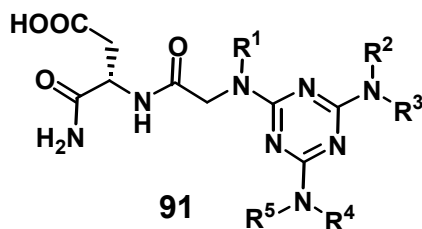
100-2: $R_t = 9,08$ min; ber. ($M+H^+$): 270,2 gef.: 268,0 (92), 236,1 (82), 209,2 (100)

100-3: $R_t = 9,08$ min; ber. ($M+H^+$): 269,2 gef.: 269,0 (100), 238,1 (75), 210,2 (30)

100-4: $R_t = 9,94$ min; ber. ($M+H^+$): 336,1 gef.: 336,0 (100), 305,1 (52), 277,1 (40), 125,1 (12)

100-5: $R_t = 8,95$ min; ber. ($M+H^+$): 306,1 gef.: 306,0 (72), 285,2 (48), 247,1 (100), 176,1 (18)

6.3.3.1 Halbautomatische Synthese einer Peptomer-[1,3,5]-Triazin-Bibliothek **91**



Die Synthese erfolgte an einer Zellulosemembran mit einem Aminoderivatisierungsgrad von 830 nmol/cm^2 . Die Kopplung des Rink-Linkers und die Synthese des Peptomerteils wurden nach AAV 11 unter Einsatz eines Pipettierroboters vorgenommen. Als Amine zur Darstellung des Peptoidteils wurden hierbei; **A-01**: Benzylamin, **A-02**: 2,4-Dichlorbenzylamin, **A-03**: *n*-Butylamin, **A-04**: Mono-Boc-1,3-diaminopropan und **A-05**: 4-Amino-1-butanol verwendet. Insgesamt wurden von jedem Peptomer 2 Zeilen à 25 SPOTs synthetisiert.

Die Immobilisierung von Cyanurchlorid erfolgte nach AAV 12. Das Spotten der Amine zur Monochlorsubstitution am Dichlor-[1,3,5]-triazinrest erfolgte mittels des Pipettierroboters, wobei folgende Amine zum Einsatz kamen; **B-01**: 2-Aminoacetaldehyddiethylacetal, **B-02**: (1S,2S) 2-Amino-1-(4-nitrophenyl)-1,3-propandiol, **B-03**: 1-(3-Aminopropyl)-4-methylpiperazin, **B-04**: Cyclohexylmethyamin, **B-05**: 2-Methoxyethylamin, **B-06**: Histamin, **B-07**: Cyclohexylamin, **B-08**: 3-Aminophenol, **B-09**: Allylamin, **B-10**: Imidazol, **B-11**: 3-Fluoranilin, **B-12**: 2-Amino-1,3-propandiol, **B-13**: 3-Chlorbenzylamin, **B-14**: 5-Amino-1-pentanol, **B-15**: Glutaminsäure(*tert*.butyl)methylester, **B-16**: 4-Phenoxyanilin, **B-17**: Piperazin, **B-18**: *p*-Anisidin, **B-19**: 1,3-Diaminopropan, **B-20**: 1,5-Diaminopentan, **B-21**: β -Alaninamid, **B-22**: 3,3-Diphenylpropylamin, **B-23**: 3-Picolylamin, **B-24**: Aminoethylthiophen und **B-25**: Homoveratrylamin.

Nach 30 min Reaktionszeit wurde die Membran gewaschen (DMF, 4 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und an der Luft getrocknet. Die Chlorsubstitution durch Amine unter Mikrowellenbestrahlung erfolgte nach AAV 17 unter Einsatz von **C-1**: Benzylamin und **C-2**: Piperidin.

Die Abspaltung der Triazinderivate vom Rink-Linker erfolgte durch TFA in der Gasphase nach AAV 19. Die Numerierung der Verbindungen **91** erfolgte durch die Codierung der eingesetzten Amine **91-A-B-C**; so bedeutet **91-I-I-I**, dass im Peptoidschritt Benzylamin, für die Chlorsubstitution bei Raumtemperatur 2-Aminoacetaldehyddiethylacetal und Benzylamin unter Mikrowellenbestrahlung eingesetzt wurde. Zur Vereinfachung ist im Folgenden nur die Codierung für die entsprechenden Bausteine angegeben.

-
- 1-1-1;** $R_t = 11,81$ min (81 %); ber. ($M+H^+$): 521,0 gef.: 520,8 (100), 389,0 (10)
- 1-2-1;** $R_t = 13,37$ min (76 %); ber. ($M+H^+$): 674,1 gef.: 673,8 (100)
- 1-3-1;** $R_t = 11,74$ min (92 %); ber. ($M+H^+$): 619,1 gef.: 618,9 (100)
- 1-4-1;** $R_t = 14,95$ min (90 %); ber. ($M+H^+$): 575,1 gef.: 575,1 (100)
- 1-5-1;** $R_t = 12,34$ min (93 %); ber. ($M+H^+$): 537,1 gef.: 537,0 (100), 405,1 (10)
- 1-6-1;** $R_t = 11,32$ min (89 %); ber. ($M+H^+$): 573,1 gef.: 572,9 (100), 441,1 (10)
- 1-7-1;** $R_t = 14,32$ min (87 %); ber. ($M+H^+$): 561,1 gef.: 561,0 (100), 429,0 (10)
- 1-8-1;** $R_t = 12,84$ min (86 %); ber. ($M+H^+$): 571,1 gef.: 571,0 (100), 439,0 (10)
- 1-9-1;** $R_t = 12,86$ min (91 %); ber. ($M+H^+$): 519,1 gef.: 518,9 (100), 387,0 (20)
- 1-10-1;** $R_t = 12,58$ min (85 %); ber. ($M+H^+$): 539,1 gef.: 530,0 (100)
- 1-11-1;** $R_t = 14,36$ min (65 %); ber. ($M+H^+$): 573,1 gef.: 573,0 (100), 441,0 (10)
- 1-12-1;** $R_t = 11,47$ min (89 %); ber. ($M+H^+$): 553,1 gef.: 553,0 (100), 405,0 (10)
- 1-13-1;** $R_t = 14,47$ min (91 %); ber. ($M+H^+$): 603,1 gef.: 603,1 (100), 407,0 (10)
- 1-14-1;** $R_t = 12,26$ min (92 %); ber. ($M+H^+$): 565,1 gef.: 564,0 (100), 433,1 (20)
- 1-15-1;** $R_t = 11,70$ min (40 %); ber. ($M+H^+$): 609,1 gef.: 609,0 (100), Nebenprodukt; $R_t = 13,98$ min (50 %); Dibenzyl-[1,3,5]-triazinderivat
- 1-16-1;** $R_t = 15,84$ min (93 %); ber. ($M+H^+$): 647,1 gef.: 647,0 (100)
- 1-17-1;** $R_t = 8,84$ min (53 %); ber. ($M+H^+$): 548,1 gef.: 548,1 (100) Nebenprodukt; $R_t = 7,36$ min (20 %); Dipiperazinyl-[1,3,5]-triazinderivat
- 1-18-1;** $R_t = 11,55$ min (92 %); ber. ($M+H^+$): 585,1 gef.: 585,1 (100),
- 1-19-1;** $R_t = 9,94$ min (68 %); ber. ($M+H^+$): 536,1 gef.: 536,1 (100)
- 1-20-1;** $R_t = 9,81$ min (78 %); ber. ($M+H^+$): 564,1 gef.: 564,0 (100)
- 1-21-1;** $R_t = 10,03$ min (43 %); ber. ($M+H^+$): 556,1 gef.: 556,0 (100)
- 1-22-1;** $R_t = 13,43$ min (83 %); ber. ($M+H^+$): 673,1 gef.: 673,0 (100)
- 1-23-1;** $R_t = 9,33$ min (87 %); ber. ($M+H^+$): 570,1 gef.: 570,1 (100)
- 1-24-1;** $R_t = 11,83$ min (93 %); ber. ($M+H^+$): 589,1 gef.: 589,0 (100)
- 1-25-1;** $R_t = 11,45$ min (81 %); ber. ($M+H^+$): 643,1 gef.: 643,2 (100)
- 2-1-1;** $R_t = 13,40$ min (83 %); ber. ($M+H^+$): 589,1 gef.: 559,0 (100), 456,9 (10)
- 2-2-1;** $R_t = 14,57$ min (76 %); ber. ($M+H^+$): 742,1 gef.: 742,0 (100)
- 2-3-1;** $R_t = 13,18$ min (87 %); ber. ($M+H^+$): 687,1 gef.: 687,1 (100)
- 2-4-1;** $R_t = 16,47$ min (72 %); ber. ($M+H^+$): 643,1 gef.: 643,0 (100)
- 2-5-1;** $R_t = 13,79$ min (93 %); ber. ($M+H^+$): 605,1 gef.: 604,9 (100)
- 2-6-1;** $R_t = 12,64$ min (90 %); ber. ($M+H^+$): 641,1 gef.: 641,0 (100), 509,0 (10)
- 2-7-1;** $R_t = 15,65$ min (86 %); ber. ($M+H^+$): 629,1 gef.: 628,9 (100), 496,9 (10)

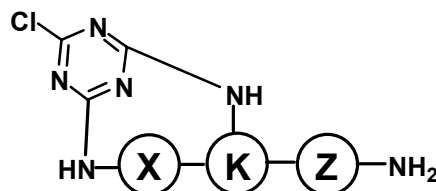
-
- 2-8-1; $R_t = 14,27$ min (88 %); ber. ($M+H^+$): 639,1 gef.: 639,2 (100)
- 2-9-1; $R_t = 12,84$ min (77 %); ber. ($M+H^+$): 587,1 gef.: 587,2 (100)
- 2-10-1; $R_t = 14,11$ min (88 %); ber. ($M+H^+$): 598,1 gef.: 598,0 (100)
- 2-11-1; $R_t = 13,48$ min (86 %); ber. ($M+H^+$): 641,1 gef.: 641,2 (100)
- 2-12-1; $R_t = 11,52$ min (76 %); ber. ($M+H^+$): 621,1 gef.: 621,2 (100)
- 2-13-1; $R_t = 13,25$ min (74 %); ber. ($M+H^+$): 671,1 gef.: 671,1 (100)
- 2-14-1; $R_t = 11,66$ min (80 %); ber. ($M+H^+$): 633,1 gef.: 633,1 (100)
- 2-15-1; $R_t = 11,22$ min (30 %); ber. ($M+H^+$): 677,1 gef.: 677,1 (100)
- 2-16-1; $R_t = 14,36$ min (88 %); ber. ($M+H^+$): 715,1 gef.: 715,1 (100)
- 2-17-1; $R_t = 8,69$ min (47 %); ber. ($M+H^+$): 616,1 gef.: 616,2 (100)
- 2-18-1; $R_t = 12,63$ min (90 %); ber. ($M+H^+$): 553,1 gef.: 553,1 (100)
- 2-19-1; $R_t = 10,88$ min (46 %); ber. ($M+H^+$): 604,1 gef.: 604,1 (100)
- 2-20-1; $R_t = 10,91$ min (80 %); ber. ($M+H^+$): 632,1 gef.: 632,1 (100)
- 2-21-1; $R_t = 11,21$ min (48 %); ber. ($M+H^+$): 618,1 gef.: 618,2 (100)
- 2-22-1; $R_t = 14,35$ min (78 %); ber. ($M+H^+$): 741,1 gef.: 741,2 (100)
- 2-23-1; $R_t = 10,44$ min (84 %); ber. ($M+H^+$): 638,1 gef.: 638,1 (100)
- 2-24-1; $R_t = 12,83$ min (89 %); ber. ($M+H^+$): 657,1 gef.: 657,1 (100)
- 2-25-1; $R_t = 12,37$ min (71 %); ber. ($M+H^+$): 711,1 gef.: 711,3 (100)
- 3-1-1; $R_t = 10,11$ min (78 %); ber. ($M+H^+$): 487,1 gef.: 487,1 (100)
- 3-2-1; $R_t = 11,17$ min (81 %); ber. ($M+H^+$): 640,1 gef.: 640,1 (100)
- 3-3-1; $R_t = 9,98$ min (80 %); ber. ($M+H^+$): 585,1 gef.: 585,1 (100)
- 3-4-1; $R_t = 12,78$ min (83 %); ber. ($M+H^+$): 541,1 gef.: 541,1 (100)
- 3-5-1; $R_t = 10,61$ min (84 %); ber. ($M+H^+$): 503,1 gef.: 503,1 (100)
- 3-6-1; $R_t = 9,56$ min (74 %); ber. ($M+H^+$): 539,1 gef.: 539,1 (100)
- 3-7-1; $R_t = 12,12$ min (79 %); ber. ($M+H^+$): 527,1 gef.: 527,2 (100)
- 3-8-1; $R_t = 10,71$ min (82 %); ber. ($M+H^+$): 537,1 gef.: 537,1 (100)
- 3-9-1; $R_t = 10,80$ min (79 %); ber. ($M+H^+$): 485,1 gef.: 485,1 (100)
- 3-10-1; $R_t = 10,59$ min (78 %); ber. ($M+H^+$): 496,1 gef.: 496,2 (100)
- 3-11-1; $R_t = 11,93$ min (76 %); ber. ($M+H^+$): 539,1 gef.: 539,1 (100)
- 3-12-1; $R_t = 9,73$ min (84 %); ber. ($M+H^+$): 519,1 gef.: 519,1 (100)
- 3-13-1; $R_t = 12,40$ min (91 %); ber. ($M+H^+$): 569,1 gef.: 569,1 (100)
- 3-14-1; $R_t = 10,46$ min (74 %); ber. ($M+H^+$): 531,1 gef.: 531,2 (100)
- 3-15-1; $R_t = 9,88$ min (20 %); ber. ($M+H^+$): 575,1 gef.: 575,2 (100)

3-16-1; $R_t = 13,14$ min (88 %); ber. ($M+H^+$): 613,1 gef.: 613,1 (100)
3-17-1; $R_t = 9,84$ min (36 %); ber. ($M+H^+$): 514,1 gef.: 514,1 (100)
3-18-1; $R_t = 11,43$ min (92 %); ber. ($M+H^+$): 551,1 gef.: 551,2 (100)
3-19-1; $R_t = 9,43$ min (68 %); ber. ($M+H^+$): 502,1 gef.: 502,2 (100)
3-20-1; $R_t = 9,66$ min (79 %); ber. ($M+H^+$): 530,1 gef.: 530,1 (100)
3-21-1; $R_t = 9,77$ min (38 %); ber. ($M+H^+$): 516,1 gef.: 516,1 (100)
3-22-1; $R_t = 13,51$ min (77 %); ber. ($M+H^+$): 639,1 gef.: 639,1 (100)
3-23-1; $R_t = 9,15$ min (89 %); ber. ($M+H^+$): 536,1 gef.: 536,1 (100)
3-24-1; $R_t = 11,77$ min (91 %); ber. ($M+H^+$): 555,1 gef.: 555,1 (100)
3-25-1; $R_t = 11,36$ min (82 %); ber. ($M+H^+$): 609,1 gef.: 609,2 (100)
4-1-1; $R_t = 7,56$ min (74 %); ber. ($M+H^+$): 488,1 gef.: 488,1 (100)
4-2-1; $R_t = 8,31$ min (68 %); ber. ($M+H^+$): 641,1 gef.: 641,1 (100)
4-3-1; $R_t = 7,28$ min (84 %); ber. ($M+H^+$): 586,1 gef.: 586,1 (100)
4-4-1; $R_t = 9,78$ min (75 %); ber. ($M+H^+$): 542,1 gef.: 542,1 (100)
4-5-1; $R_t = 7,06$ min (75 %); ber. ($M+H^+$): 504,1 gef.: 504,1 (100)
4-6-1; $R_t = 6,44$ min (68 %); ber. ($M+H^+$): 540,1 gef.: 540,1 (100)
4-7-1; $R_t = 8,88$ min (73 %); ber. ($M+H^+$): 528,1 gef.: 528,1 (100)
4-8-1; $R_t = 7,88$ min (70 %); ber. ($M+H^+$): 538,1 gef.: 538,2 (100)
4-9-1; $R_t = 7,41$ min (71 %); ber. ($M+H^+$): 486,1 gef.: 486,1 (100)
4-10-1; $R_t = 7,41$ min (65 %); ber. ($M+H^+$): 497,1 gef.: 497,1 (100)
4-11-1; $R_t = 9,34$ min (79 %); ber. ($M+H^+$): 540,1 gef.: 540,1 (100)
4-12-1; $R_t = 6,03$ min (78 %); ber. ($M+H^+$): 520,1 gef.: 520,1 (100)
4-13-1; $R_t = 9,35$ min (74 %); ber. ($M+H^+$): 570,1 gef.: 570,2 (100)
4-14-1; $R_t = 7,26$ min (83 %); ber. ($M+H^+$): 532,1 gef.: 532,2 (100)
4-15-1; $R_t = 8,57$ min (84 %); ber. ($M+H^+$): 576,1 gef.: 576,1 (100)
4-16-1; $R_t = 10,82$ min (87 %); ber. ($M+H^+$): 614,1 gef.: 614,1 (100)
4-17-1; $R_t = 6,01$ min (64 %); ber. ($M+H^+$): 515,1 gef.: 515,1 (100)
4-18-1; $R_t = 8,44$ min (85 %); ber. ($M+H^+$): 552,1 gef.: 552,1 (100)
4-19-1; $R_t = 6,08$ min (51 %); ber. ($M+H^+$): 503,1 gef.: 503,1 (100)
4-20-1; $R_t = 6,62$ min (79 %); ber. ($M+H^+$): 531,1 gef.: 531,2 (100)
4-21-1; $R_t = 6,62$ min (53 %); ber. ($M+H^+$): 517,1 gef.: 517,1 (100)
4-22-1; $R_t = 10,77$ min (77 %); ber. ($M+H^+$): 640,1 gef.: 640,1 (100)
4-23-1; $R_t = 6,16$ min (83 %); ber. ($M+H^+$): 537,1 gef.: 537,1 (100)

4-24-1; $R_t = 8,72$ min (83 %); ber. ($M+H^+$): 556,1 gef.: 556,2 (100)
4-25-1; $R_t = 8,52$ min (72 %); ber. ($M+H^+$): 610,1 gef.: 610,2 (100)
5-1-1; $R_t = 7,53$ min (68 %); ber. ($M+H^+$): 503,1 gef.: 503,1 (100)
5-2-1; $R_t = 9,22$ min (49 %); ber. ($M+H^+$): 656,1 gef.: 656,0 (100)
5-3-1; $R_t = 8,03$ min (73 %); ber. ($M+H^+$): 601,1 gef.: 601,1 (100)
5-4-1; $R_t = 10,99$ min (75 %); ber. ($M+H^+$): 557,1 gef.: 557,1 (100)
5-5-1; $R_t = 8,22$ min (68 %); ber. ($M+H^+$): 519,1 gef.: 519,1 (100)
5-6-1; $R_t = 7,56$ min (86 %); ber. ($M+H^+$): 555,1 gef.: 555,1 (100)
5-7-1; $R_t = 10,05$ min (71 %); ber. ($M+H^+$): 543,1 gef.: 543,1 (100)
5-8-1; $R_t = 8,87$ min (71 %); ber. ($M+H^+$): 553,1 gef.: 553,1 (100)
5-9-1; $R_t = 8,63$ min (80 %); ber. ($M+H^+$): 501,1 gef.: 501,3 (100)
5-10-1; $R_t = 8,40$ min (74 %); ber. ($M+H^+$): 512,1 gef.: 512,1 (100)
5-11-1; $R_t = 7,45$ min (75 %); ber. ($M+H^+$): 555,1 gef.: 555,1 (100)
5-12-1; $R_t = 10,32$ min (72 %); ber. ($M+H^+$): 535,1 gef.: 535,1 (100)
5-13-1; $R_t = 10,38$ min (73 %); ber. ($M+H^+$): 585,1 gef.: 535,1 (100)
5-14-1; $R_t = 8,29$ min (64 %); ber. ($M+H^+$): 547,1 gef.: 547,1 (100)
5-15-1; $R_t = 9,71$ min (68 %); ber. ($M+H^+$): 591,1 gef.: 591,1 (100)
5-16-1; $R_t = 11,61$ min (79 %); ber. ($M+H^+$): 629,1 gef.: 629,1 (100)
5-17-1; $R_t = 7,15$ min (72 %); ber. ($M+H^+$): 530,1 gef.: 530,2 (100)
5-18-1; $R_t = 9,52$ min (74 %); ber. ($M+H^+$): 567,1 gef.: 567,2 (100)
5-19-1; $R_t = 7,39$ min (81 %); ber. ($M+H^+$): 518,1 gef.: 518,1 (100)
5-20-1; $R_t = 7,74$ min (72 %); ber. ($M+H^+$): 546,1 gef.: 546,1 (100)
5-21-1; $R_t = 7,59$ min (46 %); ber. ($M+H^+$): 532,1 gef.: 532,1 (100)
5-22-1; $R_t = 11,76$ min (78 %); ber. ($M+H^+$): 655,1 gef.: 655,2 (100)
5-23-1; $R_t = 7,24$ min (79 %); ber. ($M+H^+$): 552,1 gef.: 552,1 (100)
5-24-1; $R_t = 9,81$ min (74 %); ber. ($M+H^+$): 571,1 gef.: 571,1 (100)
5-25-1; $R_t = 9,61$ min (78 %); ber. ($M+H^+$): 625,1 gef.: 625,2 (100)

6.3.3.2 Cyclisierungen durch intramolekulare Substitution am Dichlor-[1,3,5]-triazin an der Zellulosemembran

Variation der Ringgröße



106

Eine aminoderivatisierte Zellulosemembran wurde nach AAV 6 mit dem Photolinker acyliert. Nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe wurden die entsprechenden linearen Peptidsequenzen nach AAV 7 synthetisiert und Cyanurchlorid **5** am freien *N*-Terminus der Peptide nach AAV 12 immobilisiert. Die Cyclisierung durch nucleophile Substitution der temporär Boc-geschützten Lysinseitenkette erfolgte nach AAV 16. Die Syntheseprodukte wurden nach AAV 19 abgespalten.

Im Folgenden sind die analytischen Daten der Triazine **106** aufgeführt.

Tabelle 23

Seite 70

106-1: GAFGAFGAFK; $R_t = 12,69$ min; ber. ($M+H^+$): 1082,4 gef.: 1082,9 (100), 1066,1 (10)

106-2: GAFGAFGAKF; $R_t = 12,52$ min; ber. ($M+H^+$): 1082,4 gef.: 1082,3 (100), 1068,0 (20)

106-3: GAFGAFGKAF; $R_t = 12,53$ min; ber. ($M+H^+$): 1082,4 gef.: 1082,4 (100), 1065,9 (30)

106-4: GAFGAFKGAF; $R_t = 12,60$ min; ber. ($M+H^+$): 1082,4 gef.: 1082,7 (100), 1065,9 (10)

106-5: GAFGAKFGAF; $R_t = 12,76$ min; ber. ($M+H^+$): 1082,4 gef.: 1082,7 (100), 1065,9 (15), 918,7 (15), 643,7 (15)

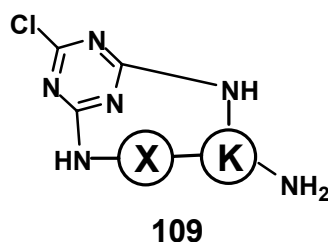
106-6: GAFGKAFGAF; $R_t = 12,68$ min; ber. ($M+H^+$): 1082,4 gef.: 1082,5 81009, 1065,6 (209, 981,5 8359, 964,6 (30), 643,6 (25), 572,5 (15)

106-7: GAFKGAFGAF; $R_t = 13,05$ min; ber. ($M+H^+$): 1082,4 gef.: 1082,4 (100), 1065,1 (15)

106-8: GAKFGAFGAF; $R_t = 12,33$ min; ber. ($M+H^+$): 1082,4 gef.: 1082,2 (100), 1065,1 (15)

106-9: GKAFGAFGAF; $R_t = 11,30$ min; ber. ($M+H^+$): 1082,4 gef.: 1082,2 (100), 1065,1 (15), 829,0 (20)

106-10: KGAFGAFGAF; ber. ($M+H^+$): 1082,4 gef.: nicht nachweisbar



Nach Beendigung der Synthese der jeweiligen linearen Peptide wurde die entsprechenden SPOTs von der restlichen Membran abgetrennt. Die Immobilisierung des Cyanurchlorids **5** und Cyclisierung erfolgte durch gemeinsame Inkubation in den entsprechenden Lösungen.

109-1: GAFGAFAFK; $R_t = 12,69$ min; ber. ($M+H^+$): 1082,4 gef.: 1082,7 (1009, 1065,9 (20)

109-2: AFGAFAFK; $R_t = 12,71$ min; ber. ($M+H^+$): 1025,4 gef.: 1025,7 (100), 1008,8 (20)

109-3: FGAFAFK; $R_t = 13,64$ min; ber. ($M+H^+$): 954,4 gef.: 954,4 (100), 794,2 (50), 647,3 (50), 576,3 (30), 263,2 (60)

109-4: GAFAFK; $R_t = 11,36$ min; ber. ($M+H^+$): 807,3 gef.: 807,5 (100), 790,6 (30)

109-5: AFAFK; $R_t = 11,47$ min; ber. ($M+H^+$): 750,3 gef.: 750,4 (100), 733,5 (25), 714,7 (20), 705,5 (10)

109-6: FAFAFK; $R_t = 12,41$ min; ber. ($M+H^+$): 679,3 gef.: 679,3 (100), 662,4 (35), 634,5 (20), 470,1 (15), 314,4 (10)

109-7: FAFAFK; $R_t = 8,62$ min; ber. ($M+H^+$): 532,2 gef.: 532,1 (100), 514,9 (50), 487,0 (30), 322,9 (60)

109-8: FAFAFK; $R_t = 9,01$ min; ber. ($M+H^+$): 475,2 gef.: 475,0 (100), 458,2 (15), 439,1 (60)

109-9: FAFAFK; $R_t = 8,82$ min; ber. ($M+H^+$): 404,2 gef.: 404,0 (100), 386,9 (30), 376,1 (35), 359,0 (30), 314,1 (60)

109-10: K; ber. ($M+H^+$): 257,1 gef.: nicht nachweisbar

Zur Strukturuntersuchung wurde die Synthese des Tripeptides AFK an einer 5 x 5 cm grossen Membran **51** nach AAV 7 (je 1 ml der Lösung der jeweiligen aktivierten Aminosäure pro Kopplung) wiederholt. Nach Entfernen der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe mit 20 %-iger Piperidin-Lösung in DMF und Waschen der Membran (DMF; 3 x, MeOH; 3 x, DCM; 3 x 5,0 ml) erfolgte die Immobilisierung durch 30 min Inkubation des Synthescharzes mit einer 50 %-igen Lösung von Cyanurchlorid in DCM (v/v) mit 1 % DIEA. Die Überschüsse wurden durch Waschen (DMF; 3 x, MeOH; 3 x, DCM; 3 x) entfernt. Zur Abspaltung der Boc-Gruppe an der ϵ -Gruppe des Lysins wurde die Membran mit TFA (95 % TFA in wässrigem DCM) eine Stunde inkubiert, gewaschen (DMF; 3 x, MeOH; 3 x, DCM; 3 x) und an der Luft getrocknet. Die Cyclisierung erfolgte nach AAV 16. Nach Abspaltung von der Membran nach AAV 19 wird **109-8** in 10 ml Wasser:Acetonitril (1:1) erhält man 1,6 mg **109-8** in Form beigen Pulvers.

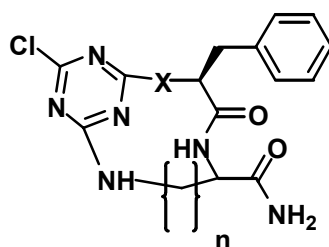
109-8: C₂₁H₂₇ClN₈O₃; R_t = 9,01 min; ber. (M+H⁺): 475,2 gef.: 475,0 (100), 458,2 (15), 439,1 (60)

¹H-NMR (300MHz, CDCl₃): δ = 7,88 (d, J= 8 Hz, 1H), 7,77 (d, J= 6 Hz, 1H), 7,66 (d, J= 9 Hz, 1H). 7,3-7,1 (m, 6H), 6,62 (d, J= 28 Hz, 21H), 4,58 (t, J= 8 Hz, 1H), 4,10 (dd, J= 4 Hz, J= 9 Hz, 1H), 3,99 (m, 1H), 3,31 (m, 1H), 2,91 (d, J= 9 Hz, 2H), 2,18 (t, J= 8 Hz, 2H), 2,00 (m, 2H), 1,89 (m, 2H), 1,08 (d, J= 8 Hz, 3H),

HRMS von **109-8**: ber. (M+H⁺): 475,1972 gef.: 475,1976

Tabelle 26

Seite 74

**112 / 113**

112-1: X = NH, n = 4; R_t = 8,96 min; ber. (M+H⁺): 404,2 gef.: 404,2 (100), 389,2 (10)

112-2: X = NH, n = 4; R_t = 8,01 min; ber. (M+H⁺): 390,2 gef.: 390,1 (100), 362,2 (20)

112-3: X = NH, n = 4; R_t = 8,93 min; ber. (M+H⁺): 376,2 gef.: 376,1 (100) 347,9 (40)

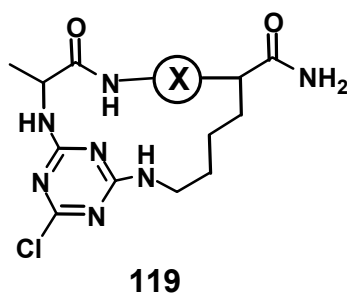
112-4: X = NH, n = 4; ber. (M+H⁺): 362,1 gef.: nicht nachweisbar

113-1: X = NHCH(CH₃)CONH, n = 4; R_t = 9,44 min; ber. (M+H⁺): 475,2 gef.: 475,2 (100), 458,3 (20), 425,2 (50)

113-2: X = NHCH(CH₃)CONH, n = 4 R_t = 9,75 min; ber. (M+H⁺): 461,2 gef.: 461,1 (100), 444,1 (20), 425,1 (60)

113-3: X = NHCH(CH₃)CONH, n = 4; R_t = 8,54 min; ber. (M+H⁺): 447,2 gef.: 447,0 (100), 411,2 (40)

113-4: X = NHCH(CH₃)CONH, n = 4; R_t = 8,49 min; ber. (M+H⁺): 433,1 gef.: 433,1 (100), 416,1 (40)

Kompatibilität mit proteinogen Aminosäuren

Eine aminoderivatisierte Zellulosemembran wurde nach AAV 6 mit dem Photolinker acyliert. Nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe wurden die entsprechenden linearen Peptidsequenzen nach AAV 7 synthetisiert und Cyanurchlorid am freien *N*-Terminus der Peptide nach AAV 12 immobilisiert. Die Cyclisierung durch nucleophile Substitution der temporär Mtt-geschützten Lysinseitenkette erfolgte nach AAV 16. Nach erfolgter Cyclisierung wurden weitere im Molekül enthaltenden Seitenschutzgruppen entfernt und die Syntheseprodukte nach AAV 19 abgespalten.

Im Folgenden sind die analytischen Daten der Triazine **119** aufgeführt (die Buchstaben entsprechen den jeweiligen Aminosäuren wie in Abb. 15 gezeigt).

X = A; $R_t = 7,08$ min; ber. ($M+H^+$): 399,2 gef.: 399,0 (100), 381,8 (12), 363,2 (30)

X = D; $R_t = 7,13$ min; ber. ($M+H^+$): 443,2 gef.: 443,0 (100), 407,2 (14)

X = E; $R_t = 7,18$ min; ber. ($M+H^+$): 457,1 gef.: 456,9 (100), 412,2 (34)

X = F; $R_t = 9,47$ min; ber. ($M+H^+$): 475,2 gef.: 475,0 (100), 458,2 (16), 439,1 (66)

X = G; $R_t = 6,92$ min; ber. ($M+H^+$): 385,2 gef.: 385,0 (100), 349,1 (22)

X = H; $R_t = 6,99$ min; ber. ($M+H^+$): 465,3 gef.: 465,0 (100), 429,0 (20)

X = I; $R_t = 8,54$ min; ber. ($M+H^+$): 441,2 gef.: 441,0 (100), 405,2 (18)

X = K; $R_t = 6,99$ min; ber. ($M+H^+$): 456,2 gef.: 456,1 (100), 420,2 (16)

X = L; $R_t = 8,88$ min; ber. ($M+H^+$): 441,2 gef.: 441,0 (100), 424,2 (16), 405,1 (68)

X = M; $R_t = 8,23$ min; ber. ($M+H^+$): 459,1 gef.: 458,9 (100), 423,2 (30)

X = N; $R_t = 6,86$ min; ber. ($M+H^+$): 442,2 gef.: 441,9 (100), 424,9 (34), 406,1 (32), 379,8 (16)

X = P; $R_t = 8,82$ min; ber. ($M+H^+$): 425,2 gef.: 424,9 (100), 389,1 (72)

X = Q; $R_t = 6,87$ min; ber. ($M+H^+$): 456,1 gef.: 455,9 (100), 420,2 (38)

X = R; $R_t = 7,18$ min; ber. ($M+H^+$): 484,2 gef.: 484,1 (100)

X = S; $R_t = 6,84$ min; ber. ($M+H^+$): 415,2 gef.: 414,9 (100), 379,1 (26)

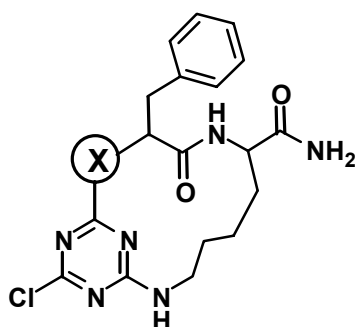
X = T; $R_t = 6,85$ min; ber. ($M+H^+$): 429,2 gef.: 429,0 (100), 393,1 (48)

X = V; $R_t = 7,75$ min; ber. ($M+H^+$): 427,3 gef.: 427,0 (100), 391,2 (62), 365,0 (16)

X = W; $R_t = 9,75$ min; ber. ($M+H^+$): 514,1 gef.: 513,9 (96), 478,2 (100), 299,9 (14), 266,0 (20), 283,2 (12)

X = Y; $R_t = 8,05$ min; ber. ($M+H^+$): 491,0 gef.: 491,0 (100), 455,1 (30)

Einfluss der *N*-terminalen Aminosäure auf die Cyclisierungseffizienz



Eine aminoderivatisierte Zellulosemembran **27** wurde nach AAV 6 mit dem Photolinker acyliert. Nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe wurden die entsprechenden linearen Peptidsequenzen nach AAV 7 synthetisiert und Cyanurchlorid am freien *N*-Terminus der Peptide nach AAV 12 immobilisiert. Die Cyclisierung durch nucleophile Substitution der temporär Mtt-geschützten Lysinseitenkette erfolgte nach AAV 16. Nach erfolgter Cyclisierung wurden weitere im Molekül enthaltenden Seitenschutzgruppen entfernt und die Syntheseprodukte nach AAV 19 abgespalten. Im Folgenden sind die analytischen Daten der Cyclen aufgeführt (die Buchstaben entsprechen den jeweiligen Aminosäuren wie in Abb. 16 gezeigt).

X = A; $R_t = 9,26$ min; ber. ($M+H^+$): 475,2 gef.: 475,3 (100), 457,9 (20), 439,6 (34)

X = D; $R_t = 7,94$ min; ber. ($M+H^+$): 519,2 gef.: 518,9 (100), 501,9 (18), 483,2 (68) 310,0 (22)

X = E; $R_t = 8,35$ min; ber. ($M+H^+$): 533,1 gef.: 532,9 (100), 497,2 (72), 471,0 (16)

X = F; $R_t = 12,58$ min; ber. ($M+H^+$): 551,2 gef.: 551,0 (100), 515,2 (62)

X = G; $R_t = 8,51$ min; ber. ($M+H^+$): 461,2 gef.: 461,0 (100), 444,0 (46), 425,1 (62)

X = H; $R_t = 7,31$ min; ber. ($M+H^+$): 541,1 gef.: 541,1 (100), 5050,2 (72)

X = I; $R_t = 12,31$ min; ber. ($M+H^+$): 517,2 gef.: 517,0 (100), 481,2 (70)

X = K; $R_t = 7,28$ min; ber. ($M+H^+$): 532,2 gef.: 532,1, 515,0 (12), 496,3 (18)

X = L; $R_t = 12,32$ min; ber. ($M+H^+$): 517,2 gef.: 517,0 (100), 481,2 (84)

X = M; $R_t = 11,15$ min; ber. ($M+H^+$): 535,2 gef.: 534,9 (100), 499,2 (84)

X = N; $R_t = 7,41$ min; ber. ($M+H^+$): 518,1 gef.: 518,0 (100), 482,2 (62)

X = P; $R_t = 11,26$ min; ber. ($M+H^+$): 501,1 gef.: 501,0 (100), 465,3 (28)

X = Q; $R_t = 7,49$ min; ber. ($M+H^+$): 532,1 gef.: 532,0 (100), 515,1 (46), 496,1 (88), 459,4 (28)

X = R; $R_t = 7,67$ min; ber. ($M+H^+$): 560,2 gef.: 560,2 (100)

X = S; $R_t = 7,66$ min; ber. ($M+H^+$): 491,2 gef.: 491,0 (100), 455,1 (86)

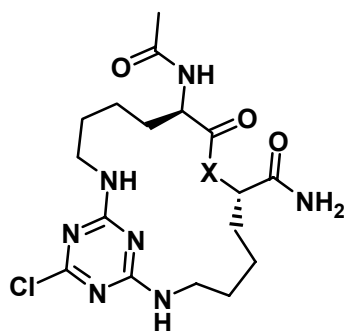
X = T; $R_t = 8,39$ min; ber. ($M+H^+$): 505,2 gef.: 504,9 (100), 469,2 (96)

X = V; $R_t = 11,38$ min; ber. ($M+H^+$): 503,2 gef.: 503,0 (96), 467,2 (100)

X = W; $R_t = 12,25$ min; ber. ($M+H^+$): 590,1 gef.: 590,0 (100), 554,2 (54),

$\mathbf{X} = \mathbf{Y}$; $R_t = 10,41$ min; ber. ($M+H^+$): 567,2 gef.: 567,0 (100), 531,1 (60)

Cyclisierungsrichtung



122-124

Eine aminoderivatisierte Zellulosemembran **27** wurde nach AAV 6 mit dem Photolinker acyliert. Nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe wurden die entsprechenden linearen Peptidsequenzen nach AAV 7 synthetisiert und die *N*-Termini der jeweiligen Sequenzen acetyliert. Die Mtt-Schutzgruppe wurde durch Inkubation der Membran mit 1 % TFA und 5 % TIPS in DCM für eine Stunde entfernt. Die Membran wird gewaschen (2 % DIEA in DMF, 3 x 2 min, DMF, 3 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 1 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und anschliessend an der Luft getrocknet. Cyanurchlorid wurde an der freien Amino-seitengruppe der Peptide nach AAV 12 immobilisiert. Die Cyclisierung durch nucleophile Substitution der temporär Boc-geschützten Lysinseitenkette erfolgte nach AAV 16. Die Syntheseprodukte wurden nach AAV 19 abgespalten.

Im Folgenden sind die analytischen Daten der Verbindungen **122-124** aufgeführt.

Tabelle 27

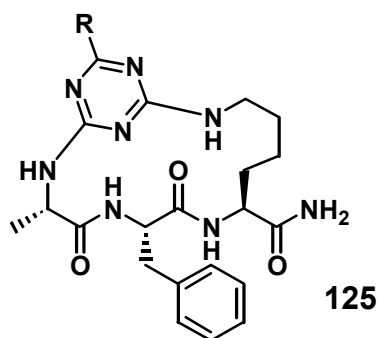
Seite 79

122: Ac-Lys-Lys; $\mathbf{X} = \mathbf{NH}$; $R_t = 8,15$ min; ber. ($M+H^+$): 427,2 gef.: 427,1 (100), 340,2 (30), 278,2 (25)

123: Ac-Lys-Phe-Lys; $\mathbf{X} = \mathbf{NH-Phe-}$; $R_t = 8,96$ min; ber. ($M+H^+$): 574,3 gef.: 574,1 (100), 559,2 (40), 529,2 (15), 365,1 (15)

124: Ac-Lys-Ala-Phe-Lys; $\mathbf{X} = \mathbf{NH-Phe-Ala}$; $R_t = 10,18$ min; ber. ($M+H^+$): 645,3 gef.: 645,1 (100), 628,2 (20), 600,3 (15)

Nucleophile Substitution an cyclischen Monochlor-[1,3,5]-triazinderivaten



Eine aminoderivatisierte Zellulosemembran **27** wurde nach AAV 6 mit dem Photolinker acyliert. Nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe wurde das Peptid Ala-Phe-Lys(Boc) nach AAV 7 synthetisiert und Cyanurchlorid am freien *N*-Terminus der Peptide nach AAV 12 immobilisiert. Die Cyclisierung durch nucleophile Substitution der temporär Boc-geschützten Lysinseitenkette erfolgte nach AAV 16. Die verbleibenden Chloratome nach erfolgter Substitution wurde nach AAV 17 bzw. AAV 18 mit den jeweiligen Nucleophilen umgesetzt. Die Syntheseprodukte wurden nach AAV 19 abgespalten.

125-1: Butylamin; $R_t = 16,21$ min; ber. ($M+H^+$): 512,3 gef.: 512,2 (100)

125-2: Piperidin; $R_t = 9,92$ min; ber. ($M+H^+$): 524,3 gef.: 524,2 (100)

125-3: 4-Amino-1-butanol; $R_t = 8,71$ min; ber. ($M+H^+$): 528,3 gef.: 528,0 (100)

125-4: 1,3-Diaminopropan; $R_t = 7,64$ min; ber. ($M+H^+$): 513,3 gef.: 513,0 (100)

125-5: *N*-Methylpiperazin; $R_t = 7,83$ min; ber. ($M+H^+$): 539,3 gef.: 539,2 (100)

125-6: Benzylamin; $R_t = 11,01$ min; ber. ($M+H^+$): 546,3 gef.: 546,0 (100)

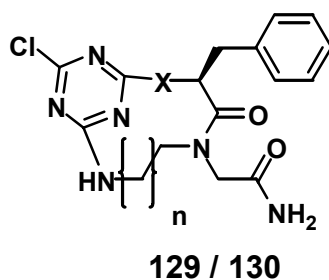
125-7: Anilin; $R_t = 10,62$ min; ber. ($M+H^+$): 532,3 gef.: 532,0 (100)

125-8: *p*-Anisidin; $R_t = 10,64$ min; ber. ($M+H^+$): 562,3 gef.: 562,2 (100), 534,3 (10)

125-9: Phenol; $R_t = 10,94$ min; ber. ($M+H^+$): 533,2 gef.: 533,0 (100)

125-10: 4-Fluorphenol; $R_t = 11,31$ min; ber. ($M+H^+$): 551,3 gef.: 551,2 (100), 523,1 (10)

Peptomere



Eine aminoderivatisierte Zellulosemembran wurde nach AAV 6 mit dem Photolinker acyliert. Nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe wurde die entsprechenden linearen Peptomere nach AAV 10 synthetisiert. Cyanurchlorid wurde am freien *N*-Terminus der Peptomere nach AAV 12 immobilisiert. Die Cyclisierung durch nucleophile Substitution der temporär Boc-geschützten Aminoseitenkette erfolgte nach AAV 16. Nach erfolgter

Cyclisierung wurden die Syntheseprodukte nach AAV 19 abgespalten.

Im Folgenden sind die analytischen Daten der Triazine **129** / **130** aufgeführt.

Tabelle 29

Seite 83

129-1: X = NH, 1,6-Diaminohexan; $R_t = 11,71$ min; ber. ($M+H^+$): 432,2 gef.: 432,1 (100), 404,2 (15)

129-2: X = NH, 1,5-Diaminopentan; $R_t = 11,27$ min; ber. ($M+H^+$): 418,2 gef.: 418,0 (100), 401,0 (25), 390,1 (30)

129-3: X = NH, 1,4-Diaminobutan; $R_t = 10,41$ min; ber. ($M+H^+$): 404,2 gef.: 404,0 (100), 387,0 (35), 376,2 (35)

129-4: X = NH, 1,3-Diaminopropan; $R_t = 9,66$ min; ber. ($M+H^+$): 390,1 gef.: 390,0 (100), 361,9 (35), 288,2 (30)

129-5: X = NH, Ethylendiamin; ber. ($M+H^+$): 376,1 gef.: nicht nachweisbar

130-1: X = NHCH(CH₃)CONH, 1,6-Diaminohexan; $R_t = 10,57$ min; ber. ($M+H^+$): 503,2 gef.: 503,1 (100), 467,3 (20)

130-2: X = NHCH(CH₃)CONH, 1,5-Diaminopentan; $R_t = 9,81$ min; ber. ($M+H^+$): 489,2 gef.: 489,1 (100), 474,0 (90), 453,3 (30), 256,1 (25)

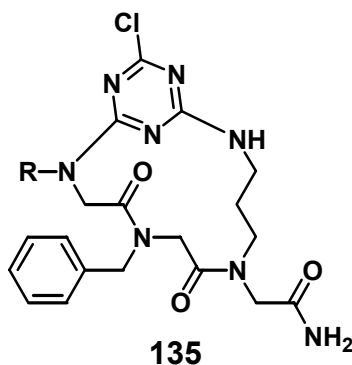
130-3: X = NHCH(CH₃)CONH, 1,4-Diaminobutan; $R_t = 9,29$ min; ber. ($M+H^+$): 475,2 gef.: 475,1 (100), 460,1 (35), 439,1 (55), 327,9 (20), 300,0 (20), 242,2 (20)

130-4: X = NHCH(CH₃)CONH, 1,3-Diaminopropan; $R_t = 8,64$ min; ber. ($M+H^+$): 461,2 gef.: 461,0 (100), 425,2 (40), 314,1 (15), 286,0 (20)

130-5: X = NHCH(CH₃)CONH, Ethylendiamin; $R_t = 8,13$ min; ber. ($M+H^+$): 447,2 gef.: 447,0 (100), 300,1 (30), 272,1 (15)

HRMS von **Nr. 9**: ber. ($M+H^+$): 461.1816, gef. = 461.1800.

Peptide



Eine aminoderivatisierte Zellulosemembran wurde nach AAV 6 mit dem Photolinker acyliert. Nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe wurden die entsprechenden linearen Peptide nach AAV 9 synthetisiert. Cyanurchlorid wurde am freien N-Terminus nach AAV 12 immobilisiert. Die Cyclisierung durch nucleophile Substitution der temporär Boc-geschützten Aminoseitenkette erfolgte nach AAV 16. Nach erfolgter Cyclisierung wurden die Syntheseprodukte nach AAV 19 abgespalten.

Im Folgenden sind die analytischen Daten der Cyclen **135** aufgeführt.

Tabelle 30

Seite 85

135-1: R = Butyl; $R_t = 11,71$ min; ber. ($M+H^+$): 503,2 gef.: 502,9 (84), 467,2 (100)

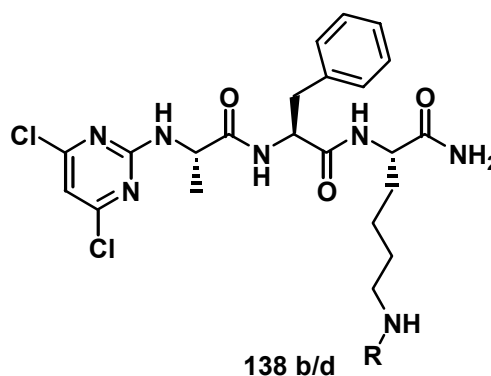
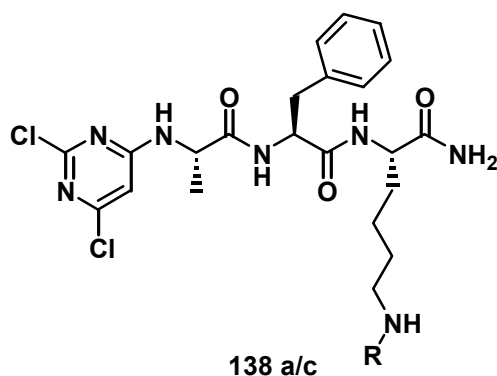
135-2: R = 4-Hydroxybutyl; $R_t = 11,71$ min; ber. ($M+H^+$): 519,2 gef.: 518,9 (92), 483,2 (100)

135-3: R = 5-Aminopentyl; $R_t = 11,71$ min; ber. ($M+H^+$): 532,2 gef.: 532,1 (100), 496,2 (30)

135-4: R = Benzyl; $R_t = 11,71$ min; ber. ($M+H^+$): 537,2 gef.: 536,9 (100), 501,2 (82),

135-5: R = *p*-Methoxyphenyl; $R_t = 11,71$ min; ber. ($M+H^+$): 553,2 gef.: 553,0 (100)

2,4,6-Trichlorpyrimidin **136**



Eine aminoderivatisierte Zellulosemembran wurde nach AAV 6 mit dem Photolinker acyliert. Nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe wurde das Peptid Ala-Phe-Lys(Boc) nach AAV 7 synthetisiert. 2,4,6-Trichlorpyrimidin **136** wurde durch Inkubation der Membran in einer 50 %-igen Lösung von **136** in NMP mit 10 % DIEA für zwei Stunden bei 80°C immobilisiert. Nach Waschen der Membran (DMF, 5 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und Trocknen an der Luft wurden die Syntheseprodukte nach AAV 19 abgespalten und mittels HPLC-MS Technik analysiert.

Nr. 138a: R = H; $R_t = 11,12$ min; ber. ($M+H^+$): 510,2 gef.: 510,1 (100), 218,0 (60), 190,1 (30)

Nr. 138c: R = H; $R_t = 12,03$ min; ber. ($M+H^+$): 510,2 gef.: 510,2 (100) 218,0 (40),

Nr. 138b: R = Boc; $R_t = 13,98$ min; ber. ($M+H^+$): 610,2 gef.: 610,0 (30), 510,2 (100), 129,5 (30)

Nr. 138d: R = Boc; $R_t = 14,86$ min; ber. ($M+H^+$): 610,2 gef.: 610,0 (100), 510,2 (90)

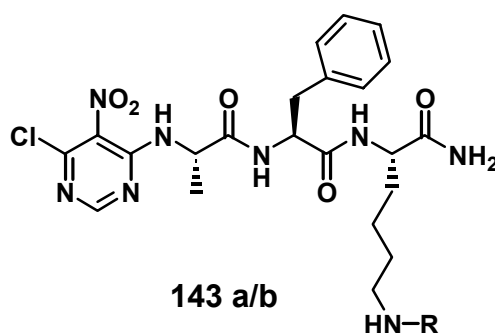
Vor der Cyclisierung wurde die Boc-Seitenkettenschutzgruppe durch Behandlung mit 80 %-iger TFA für eine Stunde und Waschen der Membran (DMF, 2 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM 2 x 2 min) entfernt. Für den Fall einer Trifluoracetylierung der ϵ -Aminogruppe des Lysins, wurde die Membran zwei Stunden mit einer 1 M wässrigen HCl-Lösung behandelt, um diese ϵ -Aminogruppe zu entschützen. Die HCl-Lösung wurde im Anschluss durch Waschen (DMF, 5 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) entfernt, und die Membran an der Luft getrocknet. Für die Cyclisierung wurde die Membran mit 20 %-iger DIEA Lösung in NMP inkubiert, und zwei Mal für jeweils drei Minuten einer Mikrowellenstrahlung ausgesetzt, wobei zwischen den Bestrahlungen erneut Base

zugegeben wurde. Nach Waschen der Membran (DMF, 5 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und Trocknen an der Luft wurden die Syntheseprodukte nach AAV 19 abgespalten und mittels HPLC-MS Technik analysiert.

Nr. 140: $R_t = 8,87$ min; ber. ($M+H^+$): 474,2 gef.: 474,1 (100), 438,3 (20)

HRMS: ber. ($M+H^+$): 474,2020 gef.: 474,2028

4,6-Dichlor-5-nitropyrimidin 141



Eine aminoderivatisierte Zellulosemembran wurde nach AAV 6 mit dem Photolinker acyliert. Nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe wurde das Peptid Ala-Phe-Lys(Boc) nach AAV 7 synthetisiert. 4,6-Dichlor-5-nitropyrimidin **141** wurde durch Inkubation der Membran in einer 1 M Lösung von **141** in NMP mit 1 % DIEA für zwei Stunden bei 80°C immobilisiert. Nach Waschen der Membran (DMF, 5 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und Trocknen an der Luft wurden die Syntheseprodukte nach AAV 19 abgespalten und mittels HPLC-MS Technik analysiert.

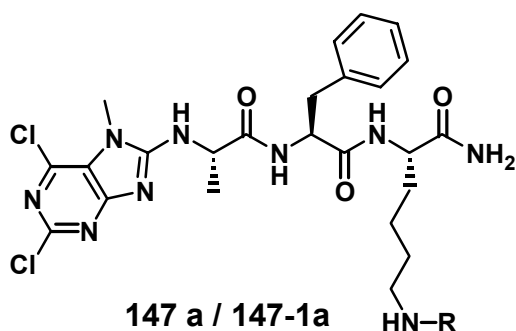
Nr. 143a: R = H; $R_t = 10,44$ min; ber. ($M+H^+$): 521,2 gef.: 521,2 (100)

Nr. 143b: R = Boc; $R_t = 14,08$ min; ber. ($M+H^+$): 621,2 gef.: 621,0 (40), 510,2 (100)

Vor der Cyclisierung wurde die Boc-Seitenkettenschutzgruppe durch Behandlung mit 80 %-iger TFA für eine Stunde und Waschen der Membran (DMF, 2 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM 2 x 2 min) entfernt. Für den Fall einer Trifluoracetylierung der ϵ -Aminogruppe des Lysins, wurde die Membran zwei Stunden mit einer 1 M wässrigen HCl-Lösung behandelt, um diese ϵ -Aminogruppe zu entschützen. Die HCl-Lösung wurde im Anschluss durch Waschen (DMF, 5 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) entfernt, und die Membran an der Luft getrocknet. Für die Cyclisierung wurde die Membran eine Stunde mit einer 1 %-igen DIEA Lösung in NMP inkubiert. Nach Waschen der Membran (DMF, 5 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und Trocknen an der Luft wurden die Syntheseprodukte nach AAV 19 abgespalten und mittels HPLC-MS Technik analysiert.

Nr. 144: $R_t = 10,98$ min; ber. ($M+H^+$): 484,2 gef.: 484,2 (100), 467,3 (20)

HRMS: ber. ($M+H^+$): 484,2183 gef.: 484,2187

2,6,8-Trichlor-7-methyl-7H-purin 145

Eine aminoderivatisierte Zellulosemembran wurde nach AAV 6 mit dem Photolinker acyliert. Nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppe wurde das Peptid Ala-Phe-Lys(Boc) nach AAV 7 synthetisiert. 2,6,8-Trichlor-7-methyl-7H-purin **145** wurde durch Inkubation der Membran in einer 50 %-igen Lösung von **145** in NMP mit 10 % DIEA für zwei Stunden bei 80°C immobilisiert. Nach Waschen der Membran (DMF, 5 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und Trocknen an der Luft wurden die Syntheseprodukte nach AAV 19 abgespalten und mittels HPLC-MS Technik analysiert.

Nr. 147: R = Boc; R_t = 12,54 min; ber. ($M+H^+$): 664,2 gef.: 664,1 (40), 564,2 (100)

Nr. 147: R = Boc; R_t = 13,46 min; ber. ($M+H^+$): 664,2 gef.: 664,0 (30), 607,1 (40), 564,2 (100)

Nr. 147-I: R = H; R_t = 8,89 min; ber. ($M+H^+$): 564,2 gef.: 564,2 (100), 528,2 (10)

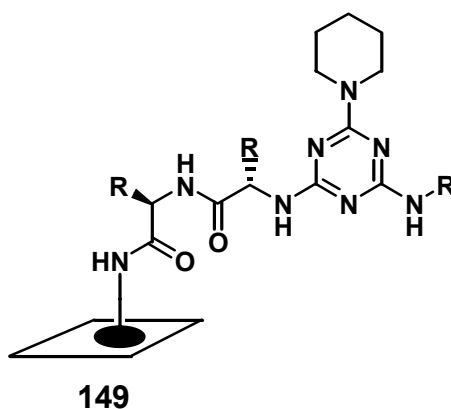
Nr. 147-I: R = H; R_t = 9,96 min; ber. ($M+H^+$): 564,2 gef.: 564,2 (100) 528,2 (20)

Vor der Cyclisierung wurde die Boc-Seitenkettenschutzgruppe durch Behandlung mit 80 %-iger TFA für eine Stunde und Waschen der Membran (DMF, 2 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM 2 x 2 min) entfernt. Für den Fall einer Trifluoracetylierung der ϵ -Aminogruppe des Lysins, wurde die Membran zwei Stunden mit einer 1 M wässrigen HCl-Lösung behandelt, um diese ϵ -Aminogruppe zu entschützen. Die HCl-Lösung wurde im Anschluss durch Waschen (DMF, 5 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) entfernt, und die Membran an der Luft getrocknet. Für die Cyclisierung wurde die Membran mit 20 %-iger DIEA Lösung in NMP inkubiert, und drei Mal für jeweils drei Minuten einer Mikrowellenbestrahlung ausgesetzt, wobei zwischen den Bestrahlungen erneut Base zugegeben wurde. Nach Waschen der Membran (DMF, 5 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) und Trocknen an der Luft wurden die Syntheseprodukte nach AAV 19 abgespalten und mittels HPLC-MS Technik analysiert.

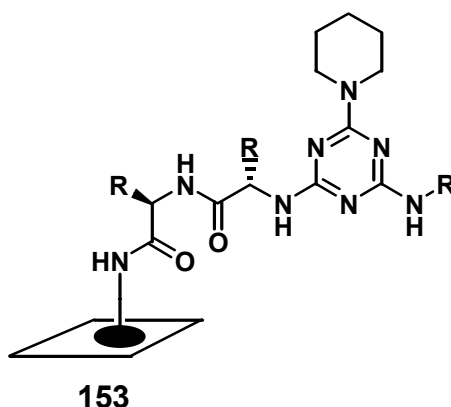
Nr. 148: R_t = 8,78 min; ber. ($M+H^+$): 528,2 gef.: 528,2 (100)

HRMS: ber. ($M+H^+$): 528,2238 gef.: 528,2254

6.3.3.3 [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken für das Festphasen-Screening

[1,3,5]-Triazin-Bibliothek 149

Die Darstellung der [1,3,5]-Triazin-Bibliothek aus 8000 Einzelverbindungen erfolgte auf einer aminoderivatisierten Zellulosemembran **27** (AAV 4, 20 x 30 cm, 220 nmol/cm²). Die Synthese der Dipeptide erfolgte nach AAV 8 (0,1 µl Volumen an Aminosäurelösung pro SPOT), wobei alle 20 proteinogenen Aminosäuren eingesetzt wurden. Auf die freien *N*-Termini der Dipeptide wurde Cyanurchlorid nach AAV 12 immobilisiert, die Substitution des zweiten Chloratoms erfolgte nach AAV 14, allerdings wurden die Quadrate auf der Zellulosemembran durch Pipettieren von 300 µl der entsprechenden Aminlösung benetzt. Als Amine wurden eingesetzt; **A01** = Cyclohexylmethylamin, **A02** = Cyclohexylamin, **A03** = Cyclopropylmethylamin, **A04** = α -Naphthylmethylamin, **A05** = Benzylamin, **A06** = 4-(2-Aminoethyl)-morpholin, **A07** = 1-(3-Aminopropyl)-4-methylpiperazin, **A08** = 1-(3-Aminopropyl)-pyrrolidin, **A09** = Tyramin, **A10** = 3-Picolylamin, **A11** = Tetrahydrofurfurylamin, **A12** = 3-Amino-1-propanol, **A13** = Isopropoxypropylamin, **A14** = Homoveratrylamin, **A15** = Tryptamin, **A16** = *n*-Octylamin, **A17** = Ethylendiamin, **A18** = 3-Chlor-4-fluoranilin, **A19** = 3-Chlorbenzylamin und **A20** = Thiophenamin. Nach Entfernen der Überschüsse wurden verbliebene Chloratome am [1,3,5]-Triazinring durch Inkubation der Membran mit einer 50 %-igen Piperidinlösung bei 80°C für 4 h substituiert. Überschüssiges Piperidin wurde durch Waschen (DMF, 4 x 2 min; Wasser, 2 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) entfernt und die Schutzgruppen der Aminosäureseitenketten nach AAV 19 abgespalten.

[1,3,5]-Triazin-Bibliothek 153-Zellulose

Die Darstellung der [1,3,5]-Triazin-Bibliothek aus 60 Einzelverbindungen erfolgte auf einer

aminoderivatisierten Zellulosemembran **27** (AAV 4, 8 x 12 cm, 260 nmol/cm²). Die Synthese der Dipeptide erfolgte nach AAV 7. Auf die freien *N*-Termini der Dipeptide wurde Cyanurchlorid nach AAV 12 immobilisiert, die Substitution des zweiten Chloratoms durch Amine erfolgte nach AAV 14, die Substitution mit Phenolaten nach AAV 15. Hierbei wurden folgende Nucleophile eingesetzt: **A01** = Cyclohexylmethylamin, **A02** = Cyclohexylamin, **A03** = 1,4-Diaminobutan, **A04** = 3-Chlorbenzylamin, **A05** = 3-Picolylamin, **A06** = 4-(2-Aminoethyl)-morpholin, **A07** = 4-Fluorphenol, **A08** = 8-Hydroxychinolin, **A09** = 4-Hydroxybenzaldehyd, **A10** = Resorcin. Nach Entfernen der Überschüsse wurden verbliebene Chloratome am [1,3,5]-Triazinring mit einer 50 %-igen Piperidinlösung nach AAV 17 substituiert. Überschüssiges Piperidin wurde durch Waschen (DMF, 4 x 2 min; Wasser, 2 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) entfernt und die Schutzgruppen der Aminosäureseitenketten nach AAV 19 abgespalten.

6.3.3.4 [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken für das Agardiffusions-Assay

Die Darstellung der untersuchten Bibliotheken erfolgte an einer Glycin-Ester-modifizierten Zellulosemembran. Die Synthese der entsprechenden Peptidsequenzen erfolgte nach AAV 7, wobei jeweils drei Replika synthetisiert wurden. Ein Replika wurde *N*-terminal acetyliert, die beiden verbleibenden Peptide wurden nach AAV 12 mit Cyanurchlorid **5** umgesetzt. Einer dieser beiden Replika wurde dann nach Entfernen der Mtt-Schutzgruppe von der Seitengruppe des Lysins nach AAV 16 cyclisiert. Anschliessend wurden alle Seitenkettenschutzgruppen entfernt, und die Verbindungen von der Membran abgespalten (AAV 19), wobei bislang nicht umgesetzte Chloratome am Triazinring durch Methylamin substituiert wurden.

Zusätzlich wurde ein weiteres Replika von einigen ausgewählten Sequenzen synthetisiert, welches nach Cyclisierung durch Cyanurchlorid **5** für eine HPLC-MS Analytik verwendet wurde. Es wurden die cyclischen [1,3,5]-Triazin-Peptide (**C**) analysiert, da sich aus dem auftreten von Fehl- bzw. Abbruchsequenzen auch auf die Reinheit der Peptide schliessen lies. Angegeben sind die Nummern der Verbindungen aus den jeweiligen Tabellen. Die Reinheiten der Verbindungen wurde nach UV-Absorption der Rohprodukte bei 220 nm bestimmt. Alle Verbindungen wurden ohne weiter Aufreinigung im Assay eingesetzt.

Tabelle 39

1-5C; $R_t = 10,32$ min (40 %); ber. ($M+H^+$): 1002,5 gef.: 1002,5 (100), 874,3 (20), 773,4 (20)

1-6C; $R_t = 11,31$ min (42 %); ber. ($M+H^+$): 1149,6 gef.: 1149,6 (100), 1048,5 (35)

1-9C; $R_t = 12,02$ min (23 %); ber. ($M+H^+$): 1538,6 gef.: 1538,4 (80), 770,1 (100 $2M+2H^+$)

1-12C; $R_t = 11,31$ min (26 %); ber. ($M+H^+$): 1680,8 gef.: 1680,7 (400), 1246,6 (30), 841,3 (100 $2M+2H^+$)

1-14C; $R_t = 11,31$ min (31 %); ber. ($M+H^+$): 1563,8 gef.: 1563,5 (90), 1462,6 (50), 782,7 (100 $2M+2H^+$)

1-17C; $R_t = 11,52$ min (39 %); ber. ($M+H^+$): 1187,6 gef.: 1187,5 (100), 1046,4 (10), 594,6 (30)

1-20C; $R_t = 6,90$ min (78 %); ber. ($M+H^+$): 707,4 gef.: 707,3 (100), 579,4 (20)

Tabelle 40

Seite 116

2-1C; $R_t = 7,11$ min (70 %); ber. ($M+H^+$): 536,3 gef.: 536,3 (100)

2-3C; $R_t = 9,20$ min (66 %); ber. ($M+H^+$): 797,5 gef.: 797,3 (100)

2-5C; $R_t = 11,61$ min (68 %); ber. ($M+H^+$): 1130,6 gef.: 1130,5 (90), 739,7 (100 $2M+2H^+$)

2-7C; $R_t = 11,01$ min (49 %); ber. ($M+H^+$): 1359,7 gef.: 1359,6,3 (30), 968,3 (50), 680,4 (100 $2M+2H^+$)

2-9C; $R_t = 12,30$ min (44 %); ber. ($M+H^+$): 1607,8 gef.: 1607,5 (30), 804,5 (100 $2M+2H^+$), 608,9 (30)

2-10C; $R_t = 12,06$ min (32 %); ber. ($M+H^+$): 1695,5 gef.: 1695,3 (20), 1303,7 (100), 848,9 (80), 803,9 (70), 652,7 (40)

2-12C; $R_t = 11,86$ min (44 %); ber. ($M+H^+$): 1664,8 gef.: 1664,7 (35), 833,1 (100 $2M+2H^+$)

2-15C; $R_t = 12,66$ min (41 %); ber. ($M+H^+$): 1394,4 gef.: 1394,4 (60), 698,1 (100 $2M+2H^+$)

2-18C; $R_t = 10,31$ min (48 %); ber. ($M+H^+$): 986,5 gef.: 986,3 (100), 862,2 (30)

2-20C; $R_t = 8,06$ min (63 %); ber. ($M+H^+$): 672,4 gef.: 674,2 (100)

Tabelle 41

Seite 117

3-1C; $R_t = 12,65$ min (43 %); ber. ($M+H^+$): 1394,4 gef.: 1394,5 (60), 698,1 (100 $2M+2H^+$)

3-2C; $R_t = 12,14$ min (55 %); ber. ($M+H^+$): 1293,6 gef.: 1293,5 (100), 647,6 (85)

3-5C; $R_t = 13,03$ min (42 %); ber. ($M+H^+$): 1266,6 gef.: 1266,5 (100), 1088,4 (40), 633,9 (20)

3-6C; $R_t = 9,94$ min (18 %); ber. ($M+H^+$): 1208,6 gef.: 1208,6 (90), 1195,3 (25), 605,1 (100 $2M+2H^+$)

3-7C; $R_t = 10,20$ min (23 %); ber. ($M+H^+$): 1247,6 gef.: 1247,4 (100), 1146,5 (25), 624,5 (80)

3-8C; $R_t = 12,69$ min (30 %); ber. ($M+H^+$): 1280,6 gef.: 1280,4 (100), 1267,2 (40), 641,1 (70)

Tabelle 42

Seite 118

4-1C; $R_t = 12,26$ min (53 %); ber. ($M+H^+$): 1293,6 gef.: 1293,1 (100), 647,4 (30)

4-2C; $R_t = 10,87$ min (43 %); ber. ($M+H^+$): 1146,5 gef.: 1146,1 (100), 10900,1 (35)

4-3C; $R_t = 11,69$ min (46 %); ber. ($M+H^+$): 1192,6 gef.: 1192,1 (100), 1179,2 (35), 763,0 (30), 596,7 (30)

4-4C; $R_t = 12,79$ min (45 %); ber. ($M+H^+$): 1165,5 gef.: 1165,1 (100), 987,1 (40)

4-5C; $R_t = 9,94$ min (38 %); ber. ($M+H^+$): 1107,5 gef.: 1107,1 (100)

4-6C; $R_t = 10,28$ min (38 %); ber. ($M+H^+$): 1146,5 gef.: 1146,2 (100), 573,8 (40)

4-7C; $R_t = 12,84$ min (40 %); ber. ($M+H^+$): 1179,5 gef.: 1179,2 (100), 590,1 (20)

6.3.4 Spezielle Synthesen von [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken an PP-Membranen

Untersuchung von Alkylaminen zur Chlorsubstitution unter SPOT-Bedingungen

Eine aminoderivatisierte PP-Membran wurde nach AAV 6 mit dem Rink-Linkerderivat **35** acyliert und nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppen wurde Cyanurchlorid **5** nach AAV 13 immobilisiert. Zur Darstellung des Triazins **60** wurden die Amine mit denen in der Tabelle angegebenen Konzentrationen nach AAV 14 am Rink-Linker umgesetzt. Nicht substituierte Chloratome wurden durch Inkubation der Membran bei 80°C (4 h) mit einer 5 M Lösung von Piperidin zur Reaktion gebracht. Nach Entfernen des Piperidinüberschusses (DMF, 4 x 2 min; Wasser, 2 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) wurde das Syntheseprodukt nach AAV 19 abgespalten.

Die Syntheseprodukte entsprachen derer von der Zellulosemembran, so dass im folgenden nur solche aufgeführt sind, die nicht bereits in Kapitel 6.3.3 beschreiben sind.

Tabelle 9

Seite 33

60-12: Cyclopentylamin; $R_t = 12,70$ min; ber. ($M+H^+$): 263,2 gef.: 263,2 (100), 195,2 (20)

Untersuchung von Arylaminen zur Chlorsubstitution unter SPOT-Bedingungen

Eine aminoderivatisierte PP-Membran wurde nach AAV 6 mit dem Rink-Linkerderivat **35** acyliert und nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppen wurde Cyanurchlorid **5** nach AAV 13 immobilisiert. Zur Darstellung des Triazins **66** wurden die Amine mit denen in der Tabelle angegebenen Konzentrationen nach AAV 14 am Rink-Linker umgesetzt. Nicht substituierte Chloratome wurden durch Inkubation der Membran bei 80°C (4h) mit einer 5 M Lösung von Benzylamin zur Reaktion gebracht. Nach Entfernen des Benzylaminüberschusses (DMF, 4 x 2 min; Wasser, 2 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) wurde das Syntheseprodukt nach AAV 19 abgespalten.

Die Syntheseprodukte entsprachen deren von der Zellulosemembran, so dass in Folgenden nur solche aufgeführt sind, die nicht bereits von der Zellulosemembran erhalten wurden.

Tabelle 14

Seite 43

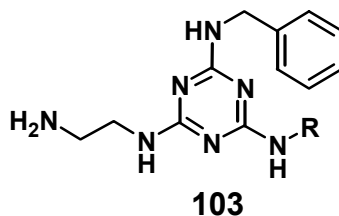
66-33: 3-Aminopyridin; $R_t = 12,87$ min; ber. ($M+H^+$): 263,2 gef.: 263,3 (100), 195,2 (26)

Untersuchung von Phenolen zur Chlorsubstitution unter SPOT-Bedingungen

Eine aminoderivatisierte PP-Membran wurde nach AAV 6 mit dem Rink-Linkerderivat **35** acyliert und nach Entfernen der Fmoc-Schutzgruppen wurde Fmoc-Glutaminsäure (Seitenketten *t*Bu-geschützt) nach AAV 13 gekoppelt. Nach Entfernen der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppen wurde Cyanurchlorid **5** nach AAV 12 immobilisiert. Zur Darstellung des Triazins **76** wurden die Phenole mit denen in der Tabelle angegebenen Konzentrationen nach AAV 15 umgesetzt. Nicht substituierte Chloratome wurden durch Inkubation der Membran bei 80°C (4 h) mit einer 5 M Lösung von Benzylamin zur Reaktion gebracht. Nach Entfernen des Benzylaminüberschusses (DMF, 4 x 2 min; Wasser, 2 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) wurde das Syntheseprodukt nach AAV 19 abgespalten.

Da die Syntheseprodukte den Untersuchungen an der Zellulose entsprachen sind die analytischen Daten nicht erneut aufgeführt.

Testsynthese am Carbamatlinker **41**



Die Synthese des Carbamatlinkers erfolgte nach AAV 6, wobei das Aktivcarbonat mit Ethylendiamin (5 M in NMP) 4 h bei 50°C umgesetzt wurde. Die Immobilisierung von Cyanurchlorid **5** erfolgte nach AAV 13 und die Substitution des Chloratoms bei Raumtemperatur am Dichlor-[1,3,5]-triazin nach AAV 14. Die Substitution unter Mikrowellenbestrahlung wurde mit Benzylamin nach AAV 17 durchgeführt. Die Syntheseprodukte wurden nach AAV 19 abgespalten.

103-1: 5-Amino-1-pentanol; $R_t = 9,10$ min; ber. ($M+H^+$): 446,2 gef.: 446,1 (100), 329,2 (20)

103-2: 1,4-Diaminobutan; $R_t = 7,45$ min; ber. ($M+H^+$): 331,2 gef.: 331,1 (100), 314,2 (18), 186,2 (28)

103-3: 2-Methoxyethylamin; $R_t = 8,89$ min; ber. ($M+H^+$): 318,2 gef.: 318,1 (100), 301,2 (25)

103-4: 3-Phenylpropylamin; $R_t = 12,28$ min; ber. ($M+H^+$): 378,2 gef.: 378,1 (100), 361,2 (35)

103-5: *p*-Anisidin; $R_t = 10,91$ min; ber. ($M+H^+$): 366,2 gef.: 366,1 (100), 349,2 (30)

[1,3,5]-Triazin-Bibliothek **153-PP**

Die Darstellung der [1,3,5]-Triazin-Bibliothek aus 60 Einzelverbindungen erfolgte auf einer aminoderivatisierten PP-Membran **31** (8 x 12 cm, 180 nmol/cm²). Die Synthese der Dipeptide erfolgte nach AAV 7. Auf die freien *N*-Termini der Dipeptide wurde Cyanurchlorid nach AAV 13 immobilisiert, die Substitution des zweiten Chloratoms durch Amine erfolgte nach AAV 14, die Substitution mit Phenolaten nach AAV 15. Hierbei wurden folgende Nucleophile eingesetzt: **A01** = Cyclohexylmethylamin, **A02** = Cyclohexylamin, **A03** = 1,4-Diaminobutan, **A04** = 3-Chlorbenzylamin, **A05** = 3-

Picolylamin, **A06** = 4-(2-Aminoethyl)-morpholin, **A07** = 4-Fluorphenol, **A08** = 8-Hydroxychinolin, **A09** = 4-Hydroxybenzaldehyd, **A10** = Resorcin. Nach Entfernen der Überschüsse wurden verbliebene Chloratome am [1,3,5]-Triazinring mit einer 50 %-igen Piperidinlösung nach AAV 17 substituiert. Überschüssiges Piperidin wurde durch Waschen (DMF, 4 x 2 min; Wasser, 2 x 2 min; MeOH, 2 x 2 min; DCM, 2 x 2 min; Et₂O, 1 x 2 min) entfernt und die Schutzgruppen der Aminosäureseitenketten nach AAV 19 abgespalten.

6.4 Durchführung der biologischen Assays

6.4.1 Bindungsstudien mit mAk TAB-2 an Triazin-Bibliotheken

Die zellulosegebundene [1,3,5]-Triazin-Bibliothek wurde mit Methanol (1 x 5 min) und TBS (3 x 10 min) gewaschen. Zur Unterdrückung unspezifischer Bindung wurde mit Blockierungs-Lösung (aus 10 ml *Blocking Reagent* und 90 ml TBS, 1 h) inkubiert. Es schloss sich eine Inkubation mit mAk TAB-2 an (1 µg/ml in Blockierungs-Lösung, 100 ml, 2 h). Die Membran wurde mit TBS/0,05 % Tween[®] 20 gewaschen (3 x 1 min). Gebundener Antikörper wurde durch Inkubation mit einem zweiten, Peroxidase-markierten anti-Maus IgG Antikörper nachgewiesen (1 µg/ml in Blockierungs-Lösung, 100 ml, 2 h). Nach Waschen mit TBS/0,05 % Tween[®] 20 (6 x 4 min) wurde die enzymatische Aktivität unter Verwendung eines Chemolumineszenz-Substrats (*Luminescence Substrate Solution A* und *B*: 100:1, 40 ml, 1 min) mittels Chemolumineszenz am Gerät LumiImager[™] nachgewiesen (Belichtungszeit 1-10 min je nach Signalintensität, so dass eine Aufnahme mit hohem Signal/Rausch Verhältnis zustande kommt). Für die Bibliothek aus 8000-Triazinderivaten war eine Belichtungszeit von 10 min, bei den kleinen Zellulose und PP-Membran gebundenen Bibliothek waren bereits 5 min ausreichend, um ein klares Signal/Rausch-Verhältnis des Bildes zu erhalten.

6.4.2 Kompetitiver ELISA am mAk TAB-2

Die Inhibitionseffekte der am Harz synthetisierten Triazine wurden in Lösung bestimmt. Hierzu wurden Mikrotiterplatten (Maxisorb, 96 Reaktionskammern, Nunc) über Nacht mit 50 µl einer Lösung von VVSHFNDPCDSHTQFAF (1 µg/ml) in wässrigem Carbonat-Puffer (pH 9,6) bei 4° inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,1 % Tween[®] 20 wurden in die Reaktionskammern die wässrige Triazin-Lösungen verschiedener Konzentrationen pipettiert. Zu den Triazin-Lösungen wurde eine Lösung (0,2 mg/ml) Peroxidase^[162] markierter mAk TAB-2 in PBS/0,1 % Tween[®] 20 mit 6 % GelifundolS gegeben und 4h inkubiert. Anschliessend wurde dreimal mit PBS/0,1 % Tween20 gewaschen. Die enzymatische Aktivität des immobilisierten TAB-2 wird durch Zusatz von 5,5 mM *o*-Phenylendiamin-Hydrochlorid und 8,5 mM Wasserstoffperoxid in 0,1 M Citratpuffer bei pH 5,0 bestimmt bei Erreichen einer optischen Dichte von 1,0 (10 min) und nachfolgender Zugabe von 1 M Schwefelsäure mit 0,05 M Natriumsulfit. Die Absorption wurde mittels eines ELISA-Readers bei 490 nm bestimmt. Diese Bestimmung wurde insgesamt zweimal durchgeführt und aus den erhaltenden Messdaten wurden die IC₅₀ Werte durch graphische Auftragung nach Koltz (100 % / (100 % * OD) gegen 1/c; mit 100% = Ø OD ohne Bindungspartner, c = Inhibitor-Konzentration)^[145] erhalten.

Verbindung	IC ₅₀ -Wert [μmol]	Verbindung	IC ₅₀ -Wert [μmol]
18-6-19	600 ± 300	A1	500 ± 100
19-6-10	> 10 ⁴	A6	>10 ³
8-7-6	> 10 ⁴	A9	90 ± 10
3-7-6	> 10 ⁴	A10	>10 ³
6-3-1	400 ± 300	D4	850 ± 50
7-8-6	> 10 ⁴	D5	400 ± 100

6.4.3 Agardiffusions-Assay mit rSSTR2-enthaltenden Reporterhefen

Das Screening wird in einer 12 x 12 cm Schale durchgeführt. Zur ausreichenden Bedeckung des Bodens mit dem Agar-Reporterhefen-Gemisch werden 30 ml benötigt. Für das Agargemisch werden 8,5 ml einer 3,6 %-igen wässrigen Agarlösung (w/w), 3,0 ml einer 20 %-igen wässrigen Glucoselösung (w/w), 3,0 ml 6,7 %-iger wässriger „Yeast Nitrogen Base“ (DIFCO, USA) in 13,5 ml Wasser suspendiert kurz erhitzt bis zum Entstehen einer klaren Lösung (ca. 2 min in eine 810 W Mikrowelle) und auf 50°C abgekühlt. Anschliessend gibt man 1,5 ml Phosphat-Puffer (pH 7,2), 0,3 ml 2 M wässriger 3-Aminotriazol Lösung (w/w), 0,15 ml 10 %-iger X-Gal-Lösung in DMF (w/w) und 0,03 ml einer 5 M wässrigen Ampicilin-Lösung (w/w) zu. In einem Zentrifugenröhrchen mit Schraubdeckel werden ca. 15 Millionen Hefezellen als Startkultur vorgelegt und mit 30 ml des Agargemisches bei 30°C versetzt. Nach gutem Durchmischen wird die Schale vorsichtig unter Vermeidung von Luftblasen mit der Suspension ausgegossen und gewartet bis der Agar aushärtet. Nach ca. 30 min können pro 12 x 12 cm Schale ca. 30 SPOTs aufgelegt werden. Die Auswertung erfolgt nach einer Inkubationszeit von drei Tagen bei 30°C.

Es empfiehlt sich die jeweiligen Resultate durch Fotografie oder elektronischer Speicherung zu sichern, da die Schalen nicht unbegrenzt lagerfähig sind.

7 Literaturverzeichnis

- [1] *SCRIP*, **1995**, No. 2040, 23.
- [2] M. E. Quirke, in A. R. Katritzky, C. W. Rees (Eds.): *Comprehensive heterocyclic chemistry*, Vol. 3, Pergamon Press, Exeter **1984**, 457-530.
- [3] K. Huthmacher, F. Hübner, in E. Schaumann (Ed.): *Houben-Weyl; Methods of organic chemistry*, Vol. E9c, Thieme, Berlin 1997, 667-796.
- [4] C. Grundmann, A. Kreuzberger; 1,3,5-Triazine, *J. Am. Chem. Soc.*, **1954**, 76, 632-633.
- [5] J. Liebig; Ueber einige Stickstoff-Verbindung, *Annalen der Pharmacie*, **1834**, 10, 1-47.
- [6] E. M. Smolin, L. Rapoport, in A. Weissberger (Ed.): *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*, Vol. 13, Interscience, New York 1959, 48-156.
- [7] J. T. Thurston, J. R. Dudley, D. W. Kaiser, I. Hechenbleikner, F. C. Schaefer, D. Holm-Hansen; Cyanuric chloride derivatives. I Amino-s-triazines, *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, 73, 2981-2983.
- [8] D. W. Kaiser, J. T. Thurston, J. R. Dudley, F. C. Schaefer, I. Hechenbleikner, D. Holm-Hansen; Cyanuric chloride derivatives II. Substituted melamines, *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, 73, 2984-2985.
- [9] A. Kreuzberger, U. Rose; Herbizide, VI Kernfluorierte 2,4-Dianilino-6-(Dihexylamino)-1,3,5-Triazine, *J. Fluorine Chem.*, **1985**, 30, 329-341.
- [10] A. Volet, M. Köhler; Light stabilities for radiocurable coating compositions, *Eur. Patent 458 741; Chem. Abstr.* 1992, **1991**, 116, 108390.
- [11] A. Goldin, M. K. Wolpert-Defilippes; Nude mouse models as predictors of chemotherapy in man: Thymidine and pyrimidines, *Bull. Cancer*, **1979**, 66, 61-66.
- [12] B. J. Foster, B. J. Harding, B. Leyland-Jones, D. Hoth; *Cancer Treatment Rev.*, **1986**, 13, 197-217.
- [13] A. Dhainaut, G. Regnier, A. Tizot, A. Pierre, S. Leonce, N. Guilbaud, L. Kraus-Berthier, G. Atassi; New purines and purine analogs as modulators of multidrug resistance, *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 4099-4108.
- [14] G. A. Argyrios, P.J. Gilligan, R.J. Chorvat, R.S. Cheeseman, T.E. Christos, R. Bakthavatchalam, J.P. Beck, A.J. Cocuzza, F.W. Hobbs, R.G. Wilde, C. Arnold, D. Chidester, M. Curry, L. He, A. Hollis, J. Klaczekiewicz, P.J. Krenitsky, P.J. Rescinito, E. Scholfield, S. Culp, E.B. De Souza, L. Fitzgerald, D. Grigoriadis, S. W. Tam, Y. N. Wong, S. M. Huang, S. H.L.; Non-peptide corticotropin-releasing hormone antagonists: Syntheses and structure-activity relationships of 2-anilinopyrimidines and -triazines, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 805-818.
- [15] J. R. Broach, J. Thorner; High-throughput screening for drug discovery, *Nature*, **1996**, 384, 14-16.
- [16] F. Balkenhohl, C. v. d. Bussche-Hünnefeld, A. Lansky, C. Zechel; Kombinatorische Synthese niedermolekularer organischer Verbindungen, *Angew. Chem.*, **1996**, 108, 2436-2488.

-
- [17] M. A. Gallop, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, E. M. Gordon; Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 1. Background and peptide combinatorial libraries, *J. Med. Chem.*, **1994**, *37*, 1233-1251.
- [18] E. M. Gordon, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, M. A. Gallop; Applications of combinatorial technologies to drug discovery. 2. Future directions, *J. Med. Chem.*, **1994**, *37*, 1385-1401.
- [19] N. K. Terrett, M. Gardner, D. W. Gordon, R. J. Kobylecki, J. Steele; Combinatorial synthesis - The design of compound libraries and their application to drug discovery, *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 8135-8173.
- [20] G. Jung, *Combinatorial peptide and nonpeptide libraries*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany **1996**.
- [21] F. Z. Dörwald, *Organic synthesis on solid phase*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany **2000**.
- [22] G. R. Gustafson, C. M. Baldino, M. M. E. Odonnell, A. Sheldon, R. J. Tarsa, C. J. Verni, D. L. Coffen; Incorporation of carbohydrates and peptides into large triazine-based screening libraries using automated parallel synthesis, *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 4051-4065.
- [23] M. Falorni, G. Giacomelli, L. Mameli, A. Porcheddu; New 1,3,5-triazine derivatives as templates for the homogeneous phase synthesis of chemical libraries, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 7607-7610.
- [24] R. B. Merrifield; Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, *85*, 2149-2154.
- [25] A. Furka, F. Sebestyén, M. Asgedom, G. Dibó; General method for rapid synthesis of multicomponent peptid mixtures, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1991**, *37*, 487-493.
- [26] K. T. Lam, M. Lebl, Krchnák; The "one-bead-one-compound" combinatorial library method, *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 411-448.
- [27] S. Brenner, R. A. Lerner; Encoded combinatorial chemistry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, *98*, 5381-5383.
- [28] J. Nielsen, S. Brenner, K. D. Janda; Synthetic methods for the implementation of encoded combinatorial chemistry, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 9812-9813.
- [29] M. Stankova, M. Lebl; Library generation through successive substitution of trichlorotriazine, *Mol. Div.*, **1996**, *2*, 75-80.
- [30] J. L. Silen, A. T. Lu, W. S. Dennis, M. A. Gore, D. Maclean, N. H. Shah, J. M. Coffin, N. S. Bhinderwala, Y. Wang, K. T. Tsutsui, G. C. Look, D. A. Campbell, R. L. Hale, M. Navre, C. R. DeLuca-Flaherty; Screening for novel antimicrobials from encoded combinatorial libraries by using a two-dimensional agar format, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1998**, *42*, 1447-1453.
- [31] H. M. Geysen, R. H. Meloen, S. J. Barteling; Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1984**, *81*, 3998-4002.
- [32] M. C. Pirrung; Spatially addressable combinatorial libraries, *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 473-488.
- [33] S. P. A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas; Light-

- directed, spatially addressable parallel chemical synthesis, *Science*, **1991**, 251, 767-773.
- [34] R. Frank; SPOT-synthesis: An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support, *Tetrahedron*, **1992**, 48, 9217-9232.
- [35] J. Schneider-Mergener, A. Kramer, U. Reineke, in R. Cortese (Ed.): *Combinatorial libraries - synthesis, screening and application potential*, Walter de Gruyter, Berlin, Germany 1996, 53-68.
- [36] A. Kramer, A. Schuster, U. Reineke, R. Malin, R. Volkmer-Engert, C. Landgraf, J. Schneider-Mergener; Combinatorial cellulose-bound peptide libraries: screening tools for the identification of peptides that bind ligands with predefined specificity, *Methods (Comp. Meth. Enzymol.)*, **1994**, 6, 388-359.
- [37] V. Krchnák, J. Vágner, P. Safár, M. Lebl; Noninvasive continuous monitoring of solid-phase peptide synthesis by acid-base indicators, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1988**, 53, 2542-2548.
- [38] A. Kramer, E. Vakalopoulou, W. D. Schleuning, J. Schneider-Mergener; A general route to fingerprintanalyses of peptide-antibody interactions using a clustered amino acid peptide library: Comparison with a phage display library, *Mol. Immunol.*, **1995**, 32, 459-465.
- [39] M. Welschof, U. Reineke, C. Kleist, S. Kipriyanov, M. Little, R. Volkmer-Engert, J. Schneider-Mergener, G. Opelz, P. Terness; The antigen-binding domain of non-idiotypic human anti- F(Ab')(2) autoantibodies - study of their interaction with IgG hinge region epitopes, *Hum. Immunol.*, **1999**, 60, 282-290.
- [40] U. Reineke, A. Kramer, J. Schneider-Mergener, in Kontermann, Dübel (Eds.): *Antibody Engineeing (Springer Lab Manual)*, Springer-Verlag, Frankfurt, Germany 1999, im Druck.
- [41] U. Reineke, S. Bhargava, M. Schutkowski, C. Landgraf, L. Germeroth, G. Fischer, J. Schneider-Mergener, in S. Bajusz, F. Hudecz (Eds.): *Peptides 1998*, Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary **1999**, 562-563.
- [42] N. Heveker, M. Montes, L. Germeroth, A. Amara, A. Trautmann, J. Schneider-Mergener; Dissociation of the signallin and antiviral properties of SDF-1-derived small peptides, *Curr. Biol.*, **1998**, 8, 369-376.
- [43] H. Gausepohl, C. Boulin, M. Kraft, R. W. Frank; Automated multiple peptide synthesis, *Pept. Res.*, **1992**, 5, 315-320.
- [44] R. Frank; Strategies and techniques in simultaneous solid phase synthesis based on the segmentation of membrane type supports., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1993**, 3, 425-430.
- [45] A. Kramer, U. Reineke, L. Dong, B. Hoffmann, U. Hoffmüller, D. Winkler, R. Volkmer-Engert, J. Schneider-Mergener; SPOT synthesis - observations and optimizations, *J. Pept. Res.*, **1999**, 54, 319-327.
- [46] H. Gausepohl, J. Weiler, S. Schwarz, R. Fitzpatrick, J. Hoheisel, in R. Ramage, R. Epton (Eds.): *Peptides 1996*, Mayflower Scientific Ltd., Kingswinford, UK **1998**, 411-412.
- [47] J. Weiler, H. Gausepohl, N. Hauser, O. N. Jensen, J. D. Hoheisel; Hybridisation

- based DNA screening on peptide nucleic acid (PNA) oligomer arrays, *Nuc. Acids Res.*, **1997**, *25*, 2792-2799.
- [48] N. Heine, T. Ast, D. Scharn, H. Wenschuh, J. Schneider-Mergener, L. Germeroth, (USA), Peptidomimetics on continuous surfaces (1998)
- [49] N. Heine, T. Ast, H. Wenschuh, U. Reineke, L. Germeroth, J. Schneider-Mergener, (Minneapolis, Minnesota, USA), High-throughput parallel synthesis of peptoids and peptomers on cellulose-membranes (1999)
- [50] N. Heine, U. Reineke, D. Scharn, T. Ast, G. Hummel, L. Jobron, M. Schmidt, L. Germeroth, M. Schulz, J. Schneider-Mergener, H. Wenschuh, *1. ICCS* (Tübingen, Germany), SPOT-synthesis approaches to the parallel assembly of organic compounds on noval membranes (1999)
- [51] N. Heine, *Chemie*, Humboldt-Universität, Berlin **2000**
- [52] T. Ast, N. Heine, L. Germeroth, J. Schneider-Mergener, H. Wenschuh; Efficient assembly of peptomers on continuous surfaces, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, *40*, 4317-4318.
- [53] S. Ostergaard, A. Holm; Peptomers: A versatile approach for the preparation of diverse combinatorial peptidomimetic bead libraries, *Mol. Div.*, **1997**, *3*, 17-27.
- [54] S. M. Miller, R. J. Simon, S. Ng, R. N. Zuckermann, J. M. Kerr, W. H. Moos; Proteolytic studies of homologous peptide and N-substituted glycine peptoid oligomers, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, *4*, 2657-2662.
- [55] R. Hirschmann; Die Medizinische Chemie im Goldenen Zeitalter der Biologie: Lehren aus der Steroid- und Peptidforschung, *Angew. Chem.*, **1991**, *103*, 1305-1330.
- [56] M. Goodman, S. Ro, in M. E. Wolff (Ed.): *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery: Principles and Practice*, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA **1995**, 803-861.
- [57] N. R. A. Beeley; Can peptides be mimicked?, *Drug Discovery Today*, **2000**, *5*, 354-363.
- [58] G. R. Marshall; A hierarchical approach to peptidomimetic design, *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 3547-3558.
- [59] G. J. Moore; Designing peptide mimetics, *Trends Pharmacol. Sci.*, **1994**, *15*, 124-129.
- [60] J. Gante; Peptidomimetika - Massgeschneiderte Enzyminhibitoren, *Angew. Chem.*, **1994**, *106*, 1780-1802.
- [61] A. Giannis, T. Kolter; Peptidmimetika für Rezeptorliganden- Entdeckung, Entwicklung und medizinische Perspektiven, *Angew. Chem.*, **1993**, *1993*, 1303-1326.
- [62] C. A. Lipinski; Bioisoterism in drug design, *Ann. Rep. Med. Chem.*, **1986**, *21*, 283-291.
- [63] A. S. Ripka, D. H. Rich; Peptidomimetic Design, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1998**, *2*, 441-452.
- [64] V. J. Hruby, J. M. Ahn, S. Liao; Synthesis of oligopeptide and peptidomimetic libraries, *Curr. Opin. Chem. Bio.*, **1997**, *1*, 114-119.

- [65] G. L. Olson, D. R. Bolin, M. P. Bonner, M. Bös, C. M. Cook, D. C. Fry, B. J. Graves, M. Hatada, D. E. Hill, M. Kahn, V. S. Madison, V. K. Rusiecki, R. Sarabu, J. Sepinwall, G. P. Vincent, M. E. Voss; Concepts and progress in the development of peptide mimetics, *J. Med. Chem.*, **1993**, *36*, 3039-3049.
- [66] M. J. Cho, R. Juliano; Macromolecular versus small-molecule therapeutics: Drug discovery, development and clinical considerations, *Trends. Biotechnol.*, **1996**, *14*, 153-158.
- [67] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney; Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug. Del. Rev.*, **1997**, *23*, 3-25.
- [68] A. Nefzi, J. M. Ostresh, R. A. Houghten; The current status of heterocyclic combinatorial libraries, *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 449-472.
- [69] W. A. Loughlin; Combinatorial synthesis: a heterocyclic chemist's perspective, *Aust. J. Chem.*, **1998**, *51*, 875-893.
- [70] R. E. Dolle; Comprehensive survey of combinatorial library synthesis: 1999, *J. Comb. Chem.*, **2000**, *2*, 383-433.
- [71] P. D. Hoeprich, B. C. Langton, J.-W. Zhang, J. P. Tam; Identification of immunodominant regions of transforming growth factor α , *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*, 19086-19091.
- [72] K. J. O'Byrne, N. Dobbs, D. J. Propper, J. P. Braybrooke, M. I. Koukourakis, K. Mitchell, J. Woodhull, D. C. Talbot, A. V. Schally, A. L. Harris; Phase-II Study of RC-160 (Vapreotide), an Octapeptide analog of somatostatin, in the treatment of metastatic breast-cancer, *Brit. J. Cancer*, **1999**, *79*, 1413-1418.
- [73] T. A. Tran, R. H. Mattern, M. Afarang, O. Amitay, O. Ziv, B. A. Morgan, J. E. Taylor, D. Hoyer, M. Goodman; Design, synthesis and biological activities of potent and selective somatostatin analogues incorporating novel peptoid residues, *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 2679-2685.
- [74] A. Chiti, B. J. Vangraafeiland, G. Savelli, L. Ferrari, E. Seregni, M. R. Castellani, E. Bombardieri; Imaging of neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors using radiolabeled somatostatin analogs, *Ital. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **1999**, *31*, 190-194.
- [75] J. R. Dudley, J. T. Thurston, F. C. Schaefer, D. Holm-Hansen, C. J. Hull, P. Adams; Cyanuric chloride derivatives. III alkoxy-s-triazines, *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, *73*, 2986-2990.
- [76] F. C. Schaefer, J. T. Thurston, J. R. Dudley; Cyanuric chloride derivatives. IV aryoxo-s-triazines, *J. Am. Chem. Soc.*, **1951**, *73*, 2990-2992.
- [77] S. B. Daniels, M. S. Bernatowicz, J. M. Cuoll, H. Koster; Membranes as solid supports for peptide synthesis, *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 4345-4348.
- [78] M. Lebl; Solid-phase synthesis on planar supports, *Biopolymers*, **1998**, *47*, 397-404.
- [79] C. P. Holmes, C. L. Adams, L. M. Kochensperger, R. B. Mortensen, L. A. Aldwin; The use of light-directed combinatorial peptide synthesis in epitope mapping, *Biopolymers*, **1995**, *37*, 199-211.
- [80] P. J. Hergenrother, K. M. Depew, S. L. Schreiber; Small-molecule microarrays:

- Covalent attachment and screening of alcohol-containing small molecules on glass slides, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 7849-7850.
- [81] D. Hudson; Matrix assisted synthetic transformations: A mosaic of diverse contributions. II The pattern is completed, *J. Comb. Chem.*, **1999**, *1*, 403-473.
- [82] H. Wenschuh, B. Hoffmann, S. Schaller, L. Germeroth, J. Schneider-Mergener, R. Volkmer-Engert, in S. Bajusz, F. Hudecz (Eds.): *Peptides 1998*, Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary **1998**, 772-773.
- [83] R. Volkmer-Engert, L. Germeroth, T. Haupt, N. Heine, D. Scharn, T. Ast, H. Matuschewski, U. Schedler, M. Ulbricht, J. Schneider-Mergener, H. Wenschuh, *25th European Peptide Symposium* (Budapest), Novel polymeric membranes for parallel solid phase SPOT-synthesis of peptides, 118-119 (**1998**)
- [84] R. Volkmer-Engert, B. Hoffmann, J. Schneider-Mergener; Stable attachment of the HMB-linker to continuous cellulose membranes for parallel solid phase SPOT Synthesis, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 1029-1032.
- [85] W. Tegge, R. Frank, F. Hofmann, W. R. G. Dostmann; Determination of cyclic nucleotide-dependent protein kinase substrate specificity by the use of peptide libraries on cellulose paper, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 10569-10577.
- [86] K. Licha, S. Bhargava, C. Rheinländer, A. Becker, J. Schneider-Mergener, R. Volkmer-Engert; Highly parallel nano-synthesis of cleavable peptide-dye conjugates on cellulose membranes, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, *41*, 1711-1715.
- [87] J. Eichler, M. Beyermann, M. Bienert; Application of cellulose paper as support material for simultaneous solid phase peptide synthesis, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1989**, *54*, 1746-1752.
- [88] R. Frank, H. Overwin; SPOT synthesis - epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes, *Methods Mol. Biol.*, **1996**, *66*, 149-169.
- [89] R. Frank; Simultaneous and combinatorial chemical synthesis techniques for the generation and screening of molecular diversity, *J. Biotechnol.*, **1995**, *41*, 259-272.
- [90] D. Klemm, B. Philipp, T. Heinze, U. Heinze, W. Wagenknecht, *Comprehensive cellulose chemistry, Vol. 1*, Wiley-VCH, Weinheim **1998**.
- [91] R. Frank, R. Döring; Simultaneous multiple peptide synthesis under continuous flow conditions on cellulose paper discs as segmental solid supports, *Tetrahedron*, **1988**, *44*, 6031-6040.
- [92] J. Eichler, M. Bienert, A. Stieranová, M. Lebl; Evaluation of cotton as a carrier for solid-phase peptide synthesis, *Pept. Res.*, **1991**, *4*, 296-307.
- [93] R. Sola, J. Mery, R. Pascal; Fmoc-based solid-phase peptide synthesis using Dpr(Phoc) linker. Synthesis of a C-terminal proline peptide, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 9195-9198.
- [94] R. H. Berg, K. Almadl, W. Batsberg Peterson, A. Holm, J. P. Tam, R. B. Merrifield; Long-chain polystyrene-grafted film matrix: A new support for solid-phase peptide synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 8024-8026.
- [95] Z. Wang, R. A. Laursen; Multiple peptide synthesis on polypropylene membranes for rapid screening of bioactives peptides, *Pept. Res.*, **1992**, *5*, 275-280.
- [96] K. Luo, P. Zhou, H. F. Lodish; The specificity of the transforming growth factor β

- receptor kinases determined by a spatially adressable peptide library, *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **1995**, 92, 11761-11765.
- [97] H. A. J. Battaerd, G. W. Tregear, *Graft Copolymers*, Interscience Publishers, New York, USA **1972**.
- [98] M. Ulbricht, K. Richau, H. Kamusewitz; *Colloids and Surfaces A Photochem. & Eng. Asp.*, **1998**, 138, 353-366.
- [99] H. Wenschuh, H. Gausepohl, L. Germeroth, M. Ulbricht, H. Matuschewski, A. Kramer, R. Volkmer-Engert, N. Heine, T. Ast, D. Scharn, J. Schneider-Mergener, in H. Fenniri (Ed.): *Combinatorial Chemistry; Practical Approach*, Oxford University Press, Oxford **2000**, 95-116.
- [100] I. W. James; Linkers for solid phase organic synthesis, *Tetrahedron*, **1999**, 55, 4855-4946.
- [101] F. Guillier, D. Orain, M. Bradley; Linkers and cleavage strategies in solid-phase organic synthesis and combinatorial chemistry, *Chem. Rev.*, **2000**, 100, 2091-2157.
- [102] A. Kramer, J. Schneider-Mergener; Synthesis and screening of peptide libraries on continuous cellulose membrane supports, *Methods Mol. Biol.*, **1998**, 87, 25-39.
- [103] H. Wenschuh, M. Schmidt, L. Germeroth, U. Reineke, D. Scharn, N. Heine, A. Rosenberg, G. Hummel, L. Jobron, J. Schneider-Mergener, H. Matuschewski, M. Ulbricht, U. Schedler, M. Schulz, in R. Epton (Ed.): , Mayflower Scientific Ltd., Birgmingham, UK 1999, im Druck.
- [104] S. Pilawa, N. Zander, R. Frank, in R. Epton (Ed.): *Innovations and perspectives in solid-phase synthesis & combinatorial libraries*, Mayflower Scientific Ltd., Birgmingham, UK **1999**, im Druck.
- [105] A. M. Bray, N. J. Maeji, A. J. Jhingran, R. Valerio; Gas phase cleavage of peptides from solid support with ammonia vapour. Application in simultaneous multiple peptide synthesis, *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 6163-6166.
- [106] H. Rink; Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin, *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 3787-3790.
- [107] C. Y. Ho, M. J. Kukla; Carbamate linkers as latent N-methylamines in solid phase synthesis, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 2799-2802.
- [108] S. S. Wang; *p*-Alkoxybenzyl alcohol resin and *p*-alkoxybenzyl-oxy-carbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments, *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, 95, 1328-1333.
- [109] S. C. McKeown, S. P. Watson, R. A. E. Carr, P. Marshall; A photolabile carbamate based dual linker analytical construct for facile monitoring of solid phase chemistry: 'TLC' for solid phase?, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40, 2407-2410.
- [110] E. B. Akerblom; Six new photolabile linkers for solid phase synthesis. 2. Coupling of various building blocks and photolytic cleavage, *Mol. Div.*, **1999**, 4, 53-69.
- [111] A. Ajayaghosh, V. N. Rajasekharan Pillai; Solid-phase synthesis and C-terminal amidation of peptides using a photolabile *o*-nitrobenzhydrylaminopolystyrene support, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 777-780.
- [112] C. P. Holmes, D. G. Jones; Reagents for combinatorial organic synthesis: Development of a new *o*-nitrobenzyl photolabile linker for solid phase synthesis, *J.*

- Org. Chem.*, **1995**, *60*, 2318-2319.
- [113] C. P. Holmes; Model studies for new o-nitrobenzyl photolabile linkers: Substituent effects on the rates of photochemical cleavage, *J. Org. Chem.*, **1997**, *62*, 2370-2380.
- [114] C. P. Holmes, D. G. Jones, B. T. Frederick, L.-C. Dong, in P. T. P. Kaumaya, R. S. Hodges (Eds.): *Peptides*, Mayflower Scientific Ltd., Kingswinford, UK **1998**.
- [115] V. N. R. Pillai; Photoremovable protecting groups in organic synthesis, *Synthesis*, **1980**, 1-26.
- [116] C. Grundmann, H. Schröder, W. Ruske; Über Triazine, XII. Mitteilung: Eine neue Bildungsweise des 1.3.5-Triazines, *Chem. Ber.*, **1954**, *87*, 1865-1868.
- [117] C. J. Cavallito, D. C. Schlieper, T. B. O'Dell; Some bis- and tris-amino and ammonium derivatives of symmetrical-triazine, *J. Org. Chem.*, **1954**, *19*, 826-829.
- [118] I. V. Martynov, Y. L. Kruklyak, V. L. Gruzdeva, G. A. Leibovskaya, L. N. Shitov, O. V. Gordybaev, V. S. Dobryanskii, I. I. Kashnikova; Synthesis and curare-like activity of β -(trialkylammonium)ethyl esters of thiocyanuric acid, *Pharm. Chem. J.*, **1991**, *25*, 30-33.
- [119] H. D. S. Ltd., , Sigma-Aldrich -Fluka Coop. **1996**
- [120] A. R. Brown, P. H. H. Hermkens, H. C. J. Ottenheijm, D. C. Rees; Solid phase synthesis, *Synlett*, **1998**, 817-819.
- [121] G. Byk, M. Frederic, D. Scherman; One pot synthesis of unsymmetrically functionalized polyamines by a solid phase strategy starting from their symmetrical polyamine-counterparts, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 3219-3222.
- [122] B. A. Dressman, L. A. Spangle, S. W. Kaldor; Solid phase synthesis of hydantoins using a carbamate linker and a novel cyclization cleavage step, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 937-940.
- [123] J. M. Ostresh, C. C. Schoner, V. T. Hamashin, A. Nefzi, J. P. Meyer, R. A. Houghten; Solid-phase synthesis of trisubstituted bicyclic guanidines via cyclization of reduced *N*-acylated dipeptides, *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 8622-8623.
- [124] G. Hübener, W. Göhring, H. J. Musiol, L. Moroder; *N*-Trifluoroacetylation of *N*-terminal hydroxyamino acids: A new side reaction in peptide synthesis, *Peptide Res.*, **1992**, *5*, 287-292.
- [125] R. Weiss, M. Hertel; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1980**, *5*, 223-224.
- [126] A. H. Schmidt, W. Plaul, A. Aimene, M. Hotz, M. Hoch; *Liebigs Ann. Chem.*, **1985**, 1021-1035.
- [127] E. E. Dueno, F. Chu, K. Seok-In, K. W. Jung; Cesium promoted O-alkylation of alcohols for the efficient ether synthesis, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, *40*, 1843-1846.
- [128] S. Caddick; Microwave assisted organic reactions, *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 10403-10432.
- [129] F. Langa, P. De la Cruz, A. De la Hoz, A. Díaz-Ortiz, E. Díez-Barra; Microwave irradiation: More than just a method for accelerating reactions, *Cont. Org. Synth.*, **1997**, *4*, 373-386.
- [130] G. V. Salmoria, E. Dall'Oglio, C. Zucco; Aromatic nucleophilic substitutions under microwave irradiation, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 2471-2474.

-
- [131] M. Goodman, J. Zhang; Peptidomimetic building blocks for drug design, *Chemtracts-Organic Chemistry*, **1997**, 10, 629-645.
- [132] D. P. Fairlie, G. Abbenante, D. R. March; Macrocyclic peptidomimetics - forcing peptides into bioactive conformations, *Curr. Med. Chem.*, **1995**, 2, 654-686.
- [133] T. J. Delia, D. Stark, S. K. Glenn; 2,4,6-Trichloropyrimidin. Reaction with ethanolamine and diethanolamine, *J. Heterocyclic Chem.*, **1995**, 32, 1177-1180.
- [134] E. Y. Sutcliffe, R. K. Robins; Electron density and orientation of nucleophilic substitution in the purine ring, *J. Org. Chem.*, **1963**, 28, 1662-1666.
- [135] M. J. McGregor, S. M. Muskal; Pharamcophore fingerprinting. 2. application to primary library design, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **2000**, 40, 117-125.
- [136] A. Linusson, J. Gottfries, F. Lindgren, S. Wold; Statistical molecular design of building blocks for combinatorial chemistry, *J. Med. Chem.*, **2000**, 43, 1320-1328.
- [137] E. J. Martin, J. M. Blaney, M. A. Siani, D. C. Spellmeyer, A. K. Wong, W. H. Moos; Measuring diversity: Experimental design of combinatorial libraries for drug discovery, *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 1431-1436.
- [138] E. J. Martin, R. E. Critchlow; Beyond mere diversity: Tailoring combinatorial libraries for drug discovery, *J. Comb. Chem.*, **2000**, 1, 32-45.
- [139] W. Ajay, P. Walters, M. A. Murcko; Can we learn to distinguish between "drug-like" and "nondrug-like" molecules?, *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 3314-3324.
- [140] J. S. Mason, I. Morize, P. R. Menard, D. L. Cheney, C. Hulme, R. F. Labaudiniere; New 4-point pharmacophore method for molecular similary and diversity applications: Overview of the method and applicatiobs, including a novel approach to the design of combinatorial libraries containing priviledged structures, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 3251-3264.
- [141] H. J. Böhm, G. Klebe, H. Kubinyi, *Wirkstoffdesign*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Germany **1996**.
- [142] A. K. Ghose, V. N. Viswanadhan, J. J. Wendoloski; A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemmistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databses, *J. Comb. Chem.*, **1999**, 1, 55-68.
- [143] C. D. Ltd, , Oxon **1998**
- [144] S. J. Teague, A. M. Davis, P. D. Leeson, T. Oprea; Design kombinatorischer Leitstruktur-Bibliotheken, *Angew. Chem.*, **1999**, 111, 3962-3967.
- [145] B. Friguet, A. F. Chaffotte, L. Djavadi-Ohaniance, M. E. Goldberg; Measurement of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay, *J. Immunol. Meth.*, **1985**, 77, 305-319.
- [146] Y. C. Patel, M. T. Greenwood, R. Panetta, L. Demchyshyn, H. Niznik, C. B. Srikant; Mini review - the somatostatin receptor family, *Life Sci.*, **1995**, 57, 1249-1265.
- [147] P. Brazeau, W. Vale, R. Burgus, N. Ling, M. Butcher, J. River, G. Guillemin; *Science*, **1973**, 179, 256-259.
- [148] S. J. Hocart, V. Reddy, W. A. Murphy, D. H. Coy; Three-dimensional quantitative

- structure-activity relationships of somatostatin analogues. 1. comparative molecular field analysis of growth hormone release-inhibiting potencies, *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 1974-1989.
- [149] T. Terasaki, H. Mizuguchi, C. Itoho, I. Tamai, M. Lemaire, A. Tsuji; Hepatic-uptake of Octreotide, a long-acting somatostatin analog, via a bile-acid transport-system, *Pharmaceut. Res.*, **1995**, *12*, 12-17.
- [150] L. Berna, R. Cabezas, J. Mora, G. Torres, M. Estorch, I. Carrio; *In-111-Octreotide and Tc-99m(V)-dimercaptosuccinic acid studies in the imaging of recurrent medullary-thyroid carcinoma*, *J. Endocrinol*, **1995**, *144*, 339-345.
- [151] H. Bender, P. O. Zamora, B. A. Rhodes, S. Guhlke, H. J. Biersack; Clinical aspects of local and regional tumor-therapy with Re-188-RC-160, *Anticancer Res*, **1997**, *17*, 1705-1712.
- [152] C. Gilon, M. Huenges, B. Mathä, G. Gellerman, V. Hornik, M. Afargan, O. Amitay, O. Ziv, E. Feller, A. Gamliel, D. Shohat, M. Wanger, O. Arad, H. Kessler; A backbone-cyclic, receptor 5-selective somatostatin analogue: synthesis, bioactivity and nuclear magnetic resonance conformational analysis, *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 919-929.
- [153] R. Hirschmann, K. C. Nicolaou, S. Pietranico, J. Salvino, E. M. Leahy, P. A. Sprengler, G. Frust, A. B. I. Smith; Nonpeptidial peptidomimetics with a β -D-glucose scaffolding. A partial somatostatin agonist bearing a close structural relationship to a potent, selective substance P antagonist, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 9217-9218.
- [154] R. Hirschmann, K. C. Nicolaou, S. Pietranico, J. Salvino, E. M. Leahy, P. A. Sprengler, G. Frust, A. B. I. Smith; De Novo design and synthesis of somatostatin non-peptide peptidomimetics utilizing β -D-glucose as a novel scaffolding, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 12550-12568.
- [155] A. Pasternak, Y. P. Pan, D. Marino, P. E. Sanderson, R. Mosley, S. P. Rohrer, E. T. Birzin, S. E. W. Huskey, T. Jacks, K. D. Schleim, K. Cheng, J. M. Schaeffer, A. A. Patchett, L. H. Yang; Potent, orally bioavailable somatostatin agonists - good absorption achieved by urea backbone cyclization, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, *9*, 491-496.
- [156] G. Osapay, L. Prokai, H. S. Kim, K. F. Medzihradszky, D. H. Coy, G. Liapakis, T. Reisine, G. Melacini, Q. Zhu, S. H. H. Wang, R. H. Mattern, M. Goodman; Lanthionine-somatostatin analogs - synthesis, characterization, biological-activity, and enzymatic stability studies, *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 2241-2251.
- [157] R. H. Mattern, T. A. Tran, M. Goodman; Conformational analyses of somatostatin-related cyclic hexapeptides containing peptoid residues, *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 2686-2692.
- [158] G. Melacini, Q. Zhu, G. Osapay, M. Goodman; A refined model for the somatostatin pharmacophore - conformational-analysis of lanthionine-sandostatin analogs, *J. Med. Chem.*, **1997**, *40*, 2252-2258.
- [159] G. Melacini, Q. Zhu, M. Goodman; Multiconformational NMR analysis of sandostatin (Octreotide)-equilibrium between beta-sheet and partially helical structures, *Biochemistry*, **1997**, *36*, 1233-1241.
- [160] D. H. Coy, J. E. Taylor; Receptor-specific somatostatin analogs - correlations with

biological-activity, *Metabolism*, **1996**, 45, 21-23.

- [161] G. M. Figliozi, R. Goldsmith, S. C. No, S. C. Banville, R. N. Zuckermann; Synthesis of *N*-substituted glycine peptoid libraries, *Methods In Enzymology*, **1996**, 267, 437-447.
- [162] M. B. Wilson, P. K. Nakane, in W. Knapp, K. Holubar, G. Wick (Eds.): *Immunofluorescence related staining techniques*, Elsevier, Amsterdam **1978**, 215-224.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Dirk Scharn, geb. 20.07.1971 in Berlin, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der darin angegebenen Hilfsmittel erstellt habe.

Berlin, den 10. Februar 2001

Dirk Scharn

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Jens Schneider-Mergener danke ich für die interessante und herausfordernde Themenstellung, seiner ständigen Diskussionsbereitschaft, die hervorragenden Arbeitsbedingungen sowie den großen Freiraum, den er mir bei der Gestaltung und Durchführung dieser Arbeit gewährte. Besonderer Dank gilt ferner Dr. Lothar Germeroth und Dr. Holger Wenschuh für die wissenschaftliche Anleitung meiner Arbeit in zahllosen Gesprächen und ihren herausragende Unterstützung. Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. Liebscher für die Betreuung der Arbeit am Institut für Chemie.

Bei der ChemotopiX GmbH und der Jerini BioTools GmbH bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises, insbesondere Niklas Heine, Thomas Ast, Rudolph Volkmer-Engert und Rolf Stigler, sowie den Mitarbeitern der Jerini BioTools GmbH, insbesondere Ulrich Reineke, Klaus Dietmeier, Frank Osterkamp, Stefan Guffler, Ulrich Hoffmüller, Gerd Hummel, Laurence Jobron, Christine Piossek, Karsten Schnatbaum und Mike Schutkowski möchte ich für das gute Arbeitsklima und ihre Unterstützung in zahlreichen Diskussionen danken.

Für die engagierte Unterstützung bei den präparativen Arbeiten danke ich Thorsten Lanz, Thomas Fischer, Ulrike Beutling, Margit Schmidt, Martina Weißbach, Iris Stimming, Marion Dietze, Uta Moerke und ganz besonders Anja Rosenberg. Für die nicht minder engagierte Unterstützung bei der Messung der biochemischen Daten danke ich Berit Hoffmann, Maren Schließ und Doreen Kurzhals.

Auch allen hier nicht erwähnten Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schneider-Mergener und der Jerini BioTools GmbH sei für ihre Unterstützung gedankt.

Für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit bedanke ich mich bei Holger Wenschuh, Frank Osterkamp, Ulrich Reineke und Diana Beyer.

Den Mitarbeitern der analytischen Abteilungen (NMR und hochaufgelöste Massenspektren) des Instituts für Angewandte Chemie Adlershof und des Instituts für Chemie der Humboldt-Universität danke ich für die sorgfältige Anfertigung der Analysen.

Mein ganz besonderen Dank gilt Diana für die ständige Unterstützung in den letzten Jahren und der Toleranz gegenüber des unordentlichen Schreibtisches und des veranstalteten Chaos. ♥ Für die nicht wissenschaftliche Unterstützung möchte ich mich bei Harald, Ina+Lars, Thorsten, Annette+Jörg+Jan, Anja, Karen+Matthias, Tina+Andre, Mäßju, Achim sowie Ute+Klaus bedanken. Ralf Bolik gilt mein Dank für die Unterstützung bzgl. des Interessenkonfliktes mit der Bundeswehr. Meinen Eltern sowie Uschi und Willi gilt für die ständige Unterstützung in allen Lebenslagen der grösste Dank.

Lebenslauf

Dirk Scharn

geb. am 20. Juli 1971 in Berlin

Schulausbildung

1977 – 1983 Grundschule, Grundschule am Teltowkanal, Berlin

1983 – 1990 Gymnasium, Albrecht-Dürer-Oberschule, Berlin

7. Juni 1990 Abitur

Hochschulausbildung

Okt. 1990 – Mrz. 1993 Grundstudium der Chemie, Freie Universität Berlin

Mrz. 1993 – Okt. 1996 Hauptstudium der Chemie, Freie Universität Berlin

Diplomarbeit (Jan. 1996 – Okt. 1996) in der Arbeitsgruppe von Prof Dr. F. E. Hahn, Institut für Allgemeine und Anorganische Chemie;; „*Untersuchungen zur Synthese von Komplexen N, N-heterocyclischer Carbene*“

25. Oktober 1996 Diplom Chemie

Seit 1997 Promotion, Humboldt-Universität Berlin

Doktorarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. J. Liebscher, Institut für Organische Chemie, angefertigt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Schneider-Mergener, Institut für Medizinische Immunologie, Charité: „*Darstellung und Screening von kombinatorischen [1,3,5]-Triazin-Bibliotheken an planaren Oberflächen*“.

Sonstige Tätigkeiten

Jan 1994 – Sep. 1996 Studentische Hilfskraft mit Unterrichtsaufgaben (Tutor) begleitend zu den Vorlesungen „Mathematik für Chemiker, Biochemiker und Mineralogen I und II“ an der Freien Universität Berlin